

*somatostatin1*基因突变斑马鱼仔鱼转录组分析

赵文婷, 陈洁, LOURO Bruno, 曹蕾, 马静, MARTINS Rute S. T., CANARIO Adelino V. M.

Transcriptome sequencing analysis of *somatostatin 1* gene mutation in zebrafish larvae

ZHAO Wenting, CHEN Jie, LOURO Bruno, CAO Lei, MA Jing, MARTINS Rute, CANARIO Adelino

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20200403009>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

利用CRISPR/Cas9构建斑马鱼*tbx20*基因突变体及其功能分析

Zebrafish *tbx20* gene knockout using CRISPR/Cas9 system and its related functions analysis

上海海洋大学学报. 2019, 28(1): 1 <https://doi.org/10.12024/jsou.20180502308>

斑马鱼胚胎发育过程中*TGF-β1*基因的表达特征分析

ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF *TGF-β1* GENE IN ZEBRAFISH EMBRYOGENESIS

水生生物学报. 2014, 38(6): 1054 <https://doi.org/10.7541/2014.155>

斑马鱼*BLT1-like*基因的克隆和表达分析

Cloning and expression analysis of *BLT1-like* genes from zebrafish(*Danio rerio*)

水产学报. 2015, 39(12): 1753 <https://doi.org/10.11964/jfc.20150609926>

逆转座子LINE1在Hela细胞中的表达及转录组分析

Expression and transcriptome analysis of retrotransposon LINE1 in HeLa cells

大连海洋大学学报. 2019, 34(2): 153 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019.02.001>

斑马鱼*fem-1c* cDNA克隆与表达分析

THE CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF ZEBRAFISH *FEM-1C*, A MEMBER OF *FEM-1* FAMILY

水生生物学报. 2015, 39(3): 459 <https://doi.org/10.7541/2015.61>

敲除*trim47*基因斑马鱼脑和脾的比较转录组学分析

COMPARATIVE TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF BRAIN AND SPLEEN IN *TRIM47* KNOCKOUT ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

水生生物学报. 2021, 45(3): 495 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.036>

文章编号: 1674-5566(2021)05-0777-12

DOI:10.12024/jsou.20200403009

somatostatin1 基因突变斑马鱼仔鱼转录组分析

赵文婷¹, 陈洁¹, LOURO Bruno², 曹蕾¹, 马静¹, MARTINS Rute S. T.², CANARIO Adelino V. M.^{1,2}

(1. 上海海洋大学 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306; 2. CCMAR-Centre of Marine Sciences, University of the Algarve, Gambelas Campus, Faro, Portugal 8005-139)

摘要: 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在斑马鱼中构建了可稳定遗传的生长抑素 (somatostatin, SST) 基因 (*sst1*) 突变体鱼系。通过比较 6 dpf (days post fertilization, dpf) 的 *sst1*^{-/-} 突变体和野生型仔鱼转录组, 发现 *sst1*^{-/-} 突变体相关生化过程和信号通路发生了显著变化。相比野生型, *sst1*^{-/-} 突变体仔鱼中有 354 个基因显著上调, 504 个基因显著下调。GO (gene ontology) 富集分析表明, 大部分差异基因与氨基酸和蛋白质生物合成相关。KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路富集显示代谢通路、氨基酸合成、氨基酰基-tRNA 合成、核糖体合成和 rRNA 加工相关通路表达增强。结果表明, *sst1*^{-/-} 突变体蛋白质生物合成和代谢过程更加活跃。RT-qPCR 验证结果显示, 随机选取的 10 个基因 mRNA 表达变化趋势与转录组测序结果一致, 说明转录组测序结果真实可靠。6 月龄突变体体质量、体长和野生型相比并无显著差异。本研究结果为进一步挖掘生长抑素基因家族的潜在功能奠定基础。

关键词: *Somatostatin1*; 斑马鱼; 代谢; 蛋白质合成

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

生长抑素 (somatostatin, SST), 又名生长激素抑制激素, 最初在绵羊的下丘脑中分离得到, 因其具有抑制垂体生长激素 (growth hormone, GH) 的分泌作用而得名^[1]。生长抑素广泛表达于中枢与外周神经系统、胰腺、胃肠道、唾液腺、甲状腺、肾脏、前列腺、胎盘、血管、淋巴和免疫相关组织^[2]。在哺乳动物中, 生长抑素具有抑制生长激素分泌和细胞增殖, 抑制胃酸、胰腺分泌与胃肠道蠕动, 调控学习和记忆等多种功能^[3]。

脊椎动物基因组中存在 6 个生长抑素基因 (*sst1-sst6*), 在进化过程中, 哺乳动物仅保留了 2 种生长抑素基因, *sst1* 和 *sst2* (*Cortistatin*, *CST*)^[4-5]。在哺乳动物中, 生长抑素前体 (preprosomatostatin, PPSS) 可以通过蛋白水解酶在不同组织中水解产生 2 种活性多肽 (SST-14 和 SST-28)。SST-28 是一种 SST-14 氨基端延长多

肽, 在肠道中被发现, 相较于 SST-14 更为活跃^[6]。在硬骨鱼类中, 基因组的额外加倍导致多个生长抑素基因的存在。研究人员已在斑马鱼基因组中发现 6 个生长抑素基因 (*sst1-sst6*)。 *sst1* 基因编码 PPSS1 前体, 水解产生 SST-14 肽, 最为古老保守, 普遍存在于所有脊椎动物中^[1,7]。 *sst2* 和 *sst5* 是在第 2 轮脊椎动物基因组加倍过程中产生的, *sst4* 是硬骨鱼类特有的, 在第 3 轮基因组加倍过程中产生, 而 *sst3* 和 *sst6* 分别由 *sst1* 和 *sst2* 串联复制产生^[8]。这就导致在鱼类中除了 SST-14 和 SST-28, 还存在 SST-22 和 SST-25 等多种形式多肽^[9]。

不同生长抑素多肽生物学功能可能不同, 它们可以结合不同的生长抑素受体 (somatostatin receptors, *sstr*), 通过抑制 Ca²⁺ 和 K⁺ 离子通道、环磷酸腺苷/蛋白激酶 A (cAMP/PKA)、丝裂原活

收稿日期: 2020-04-21 修回日期: 2020-11-15

基金项目: 上海海洋大学水产一流学科 (A1-3201-19-3020); 国家自然科学基金与葡萄牙国家科学技术基金国际 (地区) 合作项目 (UID/Multi/04326/2019)

作者简介: 赵文婷 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为斑马鱼代谢和繁殖的相互作用机制。E-mail: 1339785482@qq.com

通信作者: CANARIO Adelino V. M., E-mail: acanario@ualg.pt

化蛋白激酶(MAPK)、磷酸化酶C/肌醇三磷酸腺苷(PLC/IP3)等途径发挥功能^[10]。例如,金鱼(*Carassius auratus*)SST-14通过影响Ca²⁺信号进而抑制cAMP依赖的生长激素的分泌^[11]。点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[12]中,SST-14通过PLC/IP/PKC和AC/cAMP/PKA途径抑制生长激素的分泌。

目前为止,尽管生长抑素功能在鱼类中的报道很多,多数研究利用SS合成多肽或者抑制剂刺激下获得。由于鱼类中多种形式生长抑素多肽存在,可能导致合成多肽刺激过程中特异性不佳,实验结果并不准确。在斑马鱼中存在全部6个生长抑素基因,并且精准的基因编辑系统成熟高效,这使得斑马鱼成为研究somatostatin家族基因功能与进化关系的理想模型^[13]。本课题组已系统性地敲除*sst1-sst6*,已有研究^[14]表明:*sst4*参与斑马鱼生长调控,并影响生殖系统的发育。本研究以最古老与保守的*sst1*基因为切入点,利用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建可稳定遗传的突变体鱼系,旨在挖掘更多*sst*基因功能。使用受精后6d*sst1*突变体仔鱼与野生型进行转录组测序比较分析,发现*sst1*纯合突变体中蛋白质生物合成和代谢过程更加活跃,为进一步挖掘生长抑素在斑马鱼早期发育中的潜在功能指明了方向。

1 材料与方法

1.1 试验动物来源与饲养

使用的野生型斑马鱼为AB品系,购买于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。斑马鱼均按照上海海洋大学动物伦理委员会要求处理,按照斑马鱼养殖标准饲养。试验所用鱼均等密度养殖于循环养殖系统(Aquaneering Inc, San Diego, CA, USA),水温保持在27~28℃,pH 7.0~8.0,盐度0.25~0.75,氨氮及硝态氮质量浓度小于200 mg/L,光照采取14 h照明(光照强度:54~324 lx)和10 h黑暗。斑马鱼受精卵使用灭菌养殖水培养,并存放于28.5℃的培养箱中进行孵化。

1.2 CRISPR/Cas9 构建 *sst1* 突变体

1.2.1 CRISPR/Cas9 靶点设计

利用Ensembl genome browser数据库(<http://asia.ensembl.org/index.html>)分析*sst1*(ENS DART00000059791.4)基因外显子、内含子

与起始密码子位点。使用<http://zifit.partners.org/ZiFiT/ChoiceMenu.aspx>网站预测Cas9蛋白靶点,*sst1*基因敲除靶点选择在第1个外显子,ATG后95 bp处。利用NCBI网站检测靶点特异性。

根据靶点位置设计PCR检测引物,检测引物设计还需满足:上下游引物与靶点之间的距离大于100 bp,并且上游引物到靶点的距离和下游引物到靶点的距离之间的差大于100 bp,便于后续电泳检测。*sst1*检测引物扩增片段为480 bp,PCR扩增为单一条带,引物序列见表1。

表1 *sst1* 引物信息

Tab.1 *sst1* primer information

基因 Gene	名称 Reference	引物序列(5'-3') Primer (5'-3')
<i>sst1</i>	<i>sst1</i> -F	CACCTCCGGTAGGATTCACG
	<i>sst1</i> -R	TGTCCGTGGTCTGAAATCG
	T7- <i>sst1</i> -sfd	TAATACGACTCACTATA-target-GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
	trac rev	AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCAC

1.2.2 gRNA 制备

以pUC19-scaffold plasmid质粒为模板(北京大学分子医学研究所熊敬维教授实验室赠予),使用含有T7启动子序列、*sst1*基因gRNA靶点和scaffold特异性上游引物(T7-*sst1*-sfd)和下游通用引物(trac rev)进行PCR扩增(表1)。PCR反应体系: HIF enzyme Mix 25 μL, 上下游引物各1 μL, pUC19-scaffold plasmid质粒100 ng, 用ddH₂O补足50 μL。PCR反应条件:98℃预变性3 min;98℃变性30 s,65℃退火15 s,72℃延伸30 s,反应35个循环,最后72℃延伸5 min。使用DNA Clean & Concentrator-5(Zymo Research, D4014)试剂盒纯化PCR产物。以纯化产物为模板,使用MAXIscript[®] T7 *in vitro* Transcription Kit试剂盒进行体外转录,合成*sst1* gRNA。利用LiCl沉淀法纯化*sst1* gRNA,使用Nanodrop 2000测定gRNA含量和OD值,2%琼脂糖凝胶电泳检测gRNA质量。

1.2.3 显微注射

将1 nL含有100 pg gRNA和300 pg cas9蛋白(购于南京金斯瑞生物技术有限公司)混合物注射到1细胞期斑马鱼胚胎动物极中,共注射200枚胚胎,并保留未注射的野生型斑马鱼胚胎作对照。注射48 h后取胚胎(25枚,5枚/管)用

碱裂解法提取基因组。具体步骤:将 5 枚胚胎置于 1.5 mL 离心管中,加入 50 μL 50 mmol/L 的 NaOH,充分振荡,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 min,加入 5 μL 1 mol/L Tris-HCl,10 000 r/min 离心 6 min。取 2 μL DNA 上清液为模板,使用靶点检测引物进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 延伸,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 最后延伸 5 min。然后用 T7 核酸内切酶(T7 endonuclease I, T7E1)检测靶点敲除效率,反应体系:PCR 产物 7 μL , Buffer 2 1.1 μL , DEPC 水添加至 10 μL 。加入 0.25 μL T7E1 酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min。2% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 25 min。将 T7E1 酶切检测阳性的 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证,利用 chromas 软件分析靶点是否敲除成功。将 T7E1 酶切检测和测序为阳性的培养至成鱼,进行基因型鉴定与传代。

1.2.4 *sst1* 基因打靶 F_1 突变类型鉴定

将阳性 F_0 与野生型外交产生的 F_1 鱼系养至 3 月龄,剪取 3 月龄 F_1 尾鳍,使用碱裂解法提取基因组,使用靶点检测引物进行 PCR 扩增,通过 T7E1 酶切检测阳性产物克隆至 pMD19-T 载体进行测序,通过 Serial Cloner 软件序列比对确定 F_1 代突变类型。

1.3 总 RNA 提取和转录组测序

将有义突变 F_1 内交后获取 F_2 鱼系,通过 T7E1 酶切测序鉴定基因型,获得 F_2 纯合突变体与野生型。将 F_2 鱼系养至性成熟后,分别通过纯合突变体与野生型鱼系内交获得 F_3 胚胎。将 F_3 胚胎放置于 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵化至受精后 6 d 仔鱼。每管分别取 15 尾野生型和纯合突变体仔鱼冻存于液氮中进行总 RNA 提取,步骤:每管加入 1 mL TRIzol 试剂(Invitrogen, USA)匀浆,加入 200 μL 氯仿,使用异丙醇沉淀,75% 乙醇洗涤,最后溶于无 RNA 酶的水中。共提取 5 管野生型总 RNA 和 4 管突变体总 RNA。使用 NanoDrop 2000 (Thermo, USA)检测每个样品中总 RNA 的含量及 OD 值,利用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量。利用安捷伦 2100 生物分析仪(Agilent, San Diego, CA, USA)检测质量。使用 Illumina (Vazyme, #NR603) VAHTS stranded mRNA-seq

Library Prep Kit 制备测序文库,并使用 Illumina HiSeq X Ten (Annoroad Gene Technology, 上海, 中国)测序。

1.4 生物信息学分析

使用 Trim_galore wrapper script version 0.3.3 (Krueger, 2015, https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore)对原始读长进行质量控制和编辑,生成简单的可描述性统计学及可编辑的读长。通过 Galaxy^[15]分析平台调用 RNA-seq 比对软件 HISAT v2.1.0 版本^[16],将剪切和过滤后的序列映射到斑马鱼参考基因组(zfish_GRCz11)。使用 Ensembl Genome Browser (<http://ensembl.org>)下载相关文件和各自的注释文件(.gtf)。使用 Stringtie version 1.3.6 组装转录本和基因转录本丰度评估^[17],使用 DeSEQ2 version 2.11.40.6 建立差异表达基因^[18],差异表达基因阈值为矫正后 $P < 0.05$ 。使用 G. profiler^[19]进行 GO (gene ontology)、KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes)和 Reactome 通路富集,使用 ReViGO 除去冗余的 GO 注释,并对 GO 注释进行归纳^[20],使用 Cytoscape 进行结果展示^[21]。

1.5 荧光定量 PCR (RT-qPCR)

分别取 3 组野生型和 3 组突变体仔鱼(6 dpf)提取总 RNA。使用 PrimeScriptTM RT reagent kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒 (TaKaRa, RR047A) 将 RNA (1 μg) 反转录成 cDNA,并保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。使用 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 网站设计 RT-qPCR 引物,所有引物检测效率均为 90% ~ 105%,引物序列见表 2。以 cDNA 为模板, β -actin 为内参进行荧光定量检测。RT-qPCR 反应体系:LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master 10 μL , cDNA 1 μL ,上下游引物各 1 μL ,RNase free water 补充体系至 20 μL 。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 40 个循环。荧光定量数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak) 法进行计算,试验结果用平均值 \pm 标准误差 (Mean \pm SE) 表示,利用 Prism 6.0 作图,对需要比较显著性差异的数据进行 t 检验, $P < 0.05$ 时有显著性差异。

表2 RT-qPCR 引物信息
Tab.2 RT-qPCR primer information

基因 Gene	名称 Reference	引物序列(5'-3') Primer (5'-3')
<i>nupr1</i>	Forward	CGAAGAGGCGCATTACGACC
	Reverse	GAATGGCGATTTCGTGTCAGG
<i>phb2b</i>	Forward	AGCAGGTGCACTCGCTTATG
	Reverse	GGACGGTATCTAACTGGACCC
<i>atf7b</i>	Forward	TTGACTCCTCCCCTCCAGAC
	Reverse	TGTAGGGGTGGAACCTTGCTG
<i>stau1</i>	Forward	CAGTGAAGAAGGACCAGCCC
	Reverse	GGAGAGTGTGTTGGGCGAGA
<i>arl3</i>	Forward	TGTGGGATATTGGTGGTCAGC
	Reverse	GAATCGTTGCGGTCTGCAC
<i>tomm70a</i>	Forward	ACGGTGCACAAATCCAGAG
	Reverse	CATAGCCGATGGCTTCTGTA
<i>wwc3</i>	Forward	GTGTATGACCAGCAGGTGGG
	Reverse	TCTTGGCATTGAGAGCCTCC
<i>jak1</i>	Forward	CCACCGAGGGAACACCTCTA
	Reverse	CCATTCCCAAGCACTCGTTC
<i>pfdn5</i>	Forward	AACGCAAATCGACTTCCTTAC
	Reverse	CTGTGATGCCTGTGACTGTG
<i>ttc4</i>	Forward	TTGTACACCAACCGTGCAGC
	Reverse	GGCTTTATTGTGCTCTGGCTT
β -actin	Forward	ATGGATGAGGAAATCGCTG
	Reverse	ATGCCAACCATCACTCCCTG

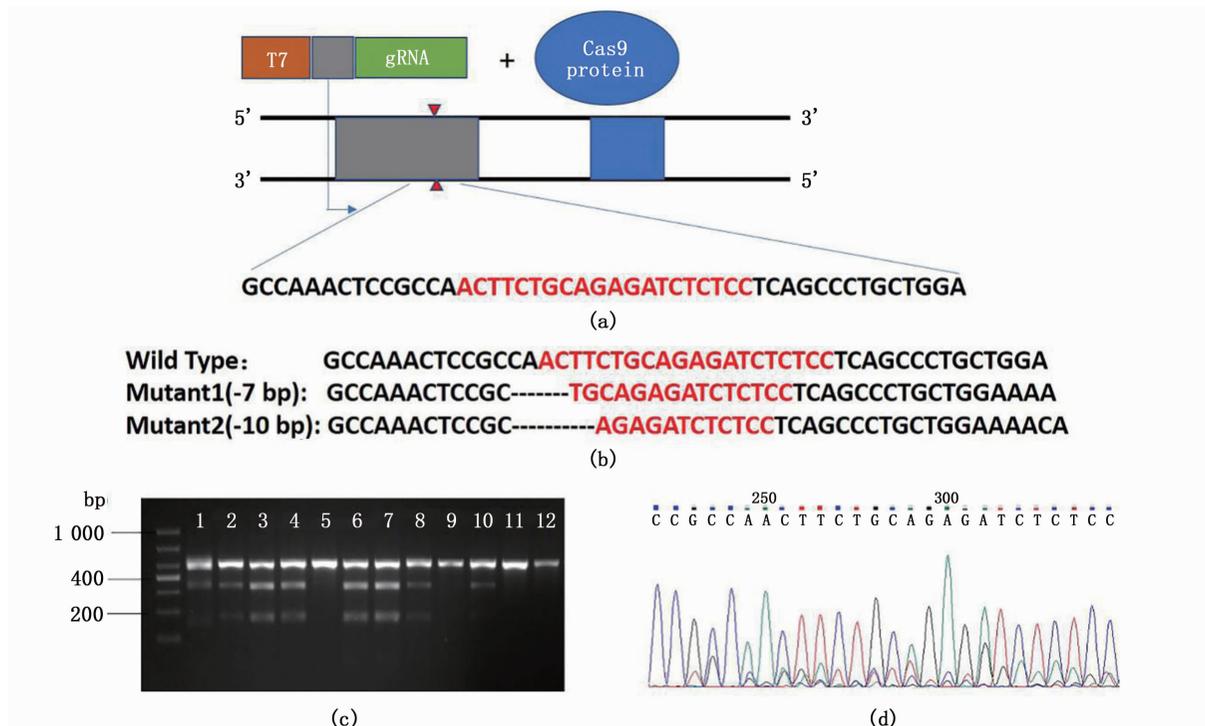
2 结果

2.1 *sst1* 突变体构建

根据 *sst1* 基因组序列,在第一外显子上设计了 CRISPR/Cas9 系统靶向位点,靶点长度为 20 bp,靶点序列信息如图 1a。将 gRNA 与 Cas9 蛋白共同注射到 1 细胞期的野生型斑马鱼胚胎中,使用 T7E1 酶对 48 hpf 胚胎进行酶切检测(图 1c),同时对 PCR 产物测序验证,发现在靶点处出现乱峰(图 1d),表明 *sst1* gRNA 成功编辑靶点。将阳性 F_0 与野生型外交产生 F_1 杂合子鱼系,获得缺失 7 bp 和 10 bp 两种移码突变(图 1b),致使转录提前终止(图 2)。 F_1 内交后的鱼系混合养殖,避免养殖密度与喂食对试验结果造成影响。将 6 dpf F_3 野生型和突变体仔鱼进行转录组分析。

2.2 转录组序列质量分析

对 6 dpf *sst1*^{-/-} 突变体和野生型仔鱼转录组测序分析,共产生 174 849 174 个原始读长(野生型平均 21 148 551 个,突变体平均 17 276 605 个),去除低质量、Ns 和接头污染序列,得到 170 625 884 个高质量读长,Q30 为 95%(表 3)。

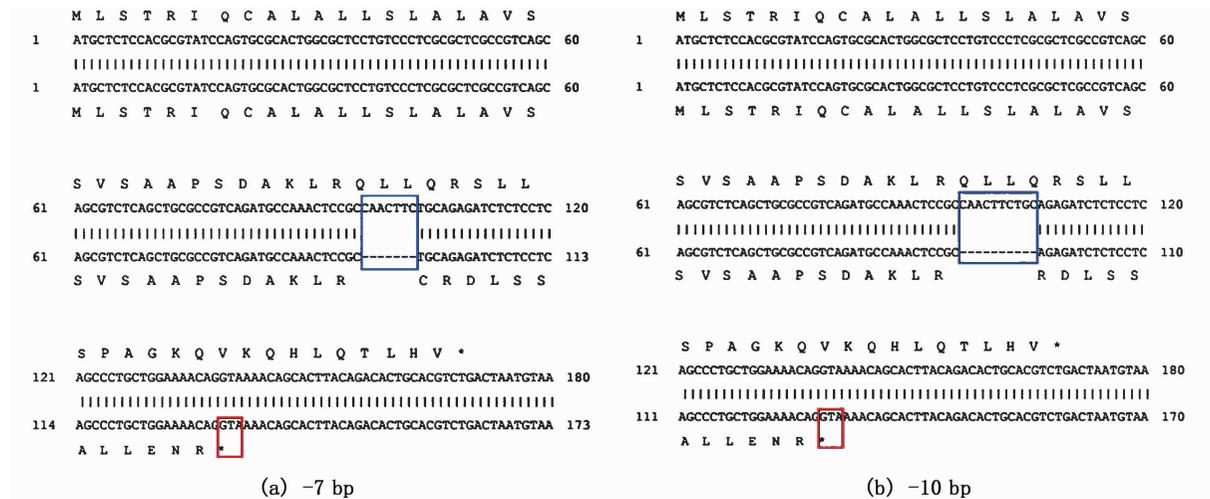


(a) *sst1* 基因第一个外显子上的靶点序列;(b)野生型和 *sst1*^{-/-} DNA 序列信息,突变体 1: -7 bp,突变体 2: -10 bp;(c) T7E1 酶切检测;(d) 测序图谱。

(a) Structure of the target sequence in exon 1 of *sst1* gene; (b) The DNA sequences of wild-type and *sst1*^{-/-}, which shows the sequences of deleted 7 bp in mutant 1 and deleted 10 bp in mutant 2; (c) T7E1 enzyme digestion; (d) Sequencing map.

图1 CRISPR/Cas9 构建斑马鱼 *sst1* 突变体

Fig.1 CRISPR/Cas9-mediated *sst1* mutant in zebrafish



“*”代表终止密码子;蓝色方框代表与野生型相比,突变体缺失碱基;红色方框代表终止密码子。
 “*” represents a termination codon; Blue box represents the deletion of the base compared with the wild type; Red box represents the termination codon.

图 2 野生型和 *sst1*^{-/-} 突变体氨基酸比对

Fig. 2 Amino acid comparison between the wild-type and *sst1*^{-/-} mutant

表 3 野生型和 *sst1*^{-/-} 突变体转录组序列信息

Tab. 3 Information of transcriptome sequencing of wild-type and *sst1*^{-/-} mutant

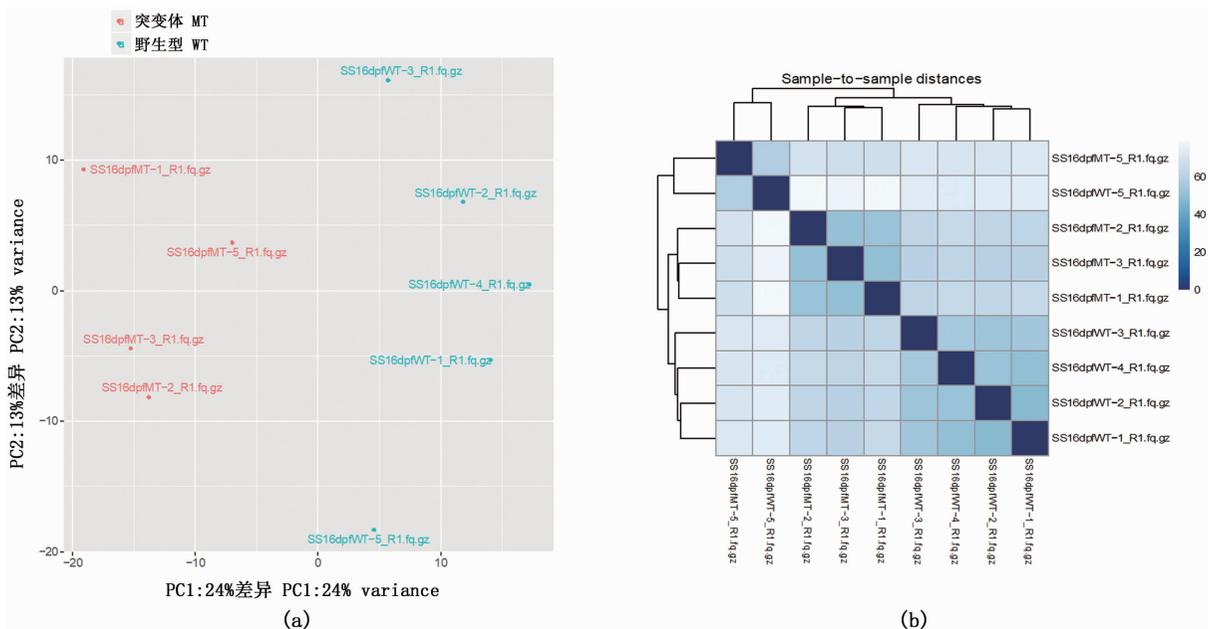
转录组序列信息 Information of transcriptome sequencing	野生型 Average WT	突变体 Average MT
原始序列数 Raw reads number	2.11 × 10 ⁷ ± 2.60 × 10 ⁶	1.73 × 10 ⁷ ± 1.04 × 10 ⁶
高质量序列数 Clean reads number	2.06 × 10 ⁷ ± 2.56 × 10 ⁶	1.69 × 10 ⁷ ± 9.8 × 10 ⁵
高质量序列百分比 Clean reads / %	97.00 ± 0.46	98.00 ± 0.26
低质量序列数 Low-quality reads number	6.82 × 10 ⁴ ± 5.94 × 10 ³	6.08 × 10 ⁴ ± 2.18 × 10 ⁴
Ns 序列数量 Ns reads number	7.48 × 10 ³ ± 1.46 × 10 ³	5.65 × 10 ³ ± 1.96 × 10 ³
污染序列数 Adapter polluted reads number	4.80 × 10 ⁵ ± 9.22 × 10 ⁴	3.02 × 10 ⁵ ± 4.85 × 10 ⁴
原始序列中质量大于 30 的碱基数比例 Raw Q30 bases / %	94.00 ± 0.07	94.00 ± 0.11
高质量序列中质量大于 30 的碱基数比例 Clean Q30 bases / %	95.00 ± 0.06	95.00 ± 0.11

注:数值以“平均值 ± 标准差”表示。
 Notes: Value represents “Mean ± SD”.

2.3 差异表达基因

基于基因表达数据主成分和相关性分析表明,*sst1*^{-/-} 突变体和野生型样本之间出现明显分离,同一组样本之间呈现高相关性(图 3)。比较分析后发现,*sst1*^{-/-} 突变体与野生型之间共有 858 个差异表达基因,其中,354 个基因表达显著上调,504 个基因表达显著下调。表达差异最显著的 10 个基因,包括 4 个显著上调的基因:核蛋白 1 (nuclear protein 1, *nupr1*)、蛋白磷酸酶 2 磷酸酶激活剂 (protein phosphatase 2 phosphatase activator, *ptpa*)、抗增殖蛋白 2b (prohibitin 2b, *phb2b*)、锌指蛋白 518A (zinc finger protein 518A, *znf518a*)。6 个显著下调的基因:WWC 家族成员 3 (WWC family member 3, *wwc3*)、四肽重复结构

域 4 (tetratricopeptide repeat domain 4, *ttc4*)、非编码 RNA (*LOC100535170*)、PPFIA 结合蛋白 1b (PPFIA binding protein 1b, *ppfibp1b*)、线粒体外膜 70 同系物 A 移位酶 (translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A, *tomm70a*) 和 1 个未知蛋白的编码基因 (*si; ch211-281124.3*) (表 4)。突变体中有 2 个与 SST-GH-IGF (somatostatin-growth hormone-insulin like growth factor) 轴相关的显著下调差异基因,为胰岛素样生长因子结合蛋白 1a (insulin-like growth factor binding protein 1a, *igfbp1a*) 和胰岛素样生长因子结合蛋白 5a (insulin-like growth factor binding protein 5a, *igfbp5a*)。



(a) 野生型和 *sst1*^{-/-} 突变体转录组主成分分析, 两组间沿 PC1 分离; (b) 野生型和 *sst1*^{-/-} 突变体样本间相关性, 颜色越深表明样本间的相关性越高。

(a) Principal components analysis of transcriptome samples from wild-type and *sst1*^{-/-} mutant showing separation between the two groups along PC1; (b) Correlation of distances between wild-type and *sst1*^{-/-} mutant samples, and a darker colour indicates a higher correlation between samples.

图 3 测序数据总结

Fig. 3 Summary of sequencing data processing

表 4 突变体比野生型表达差异最显著的 10 个基因

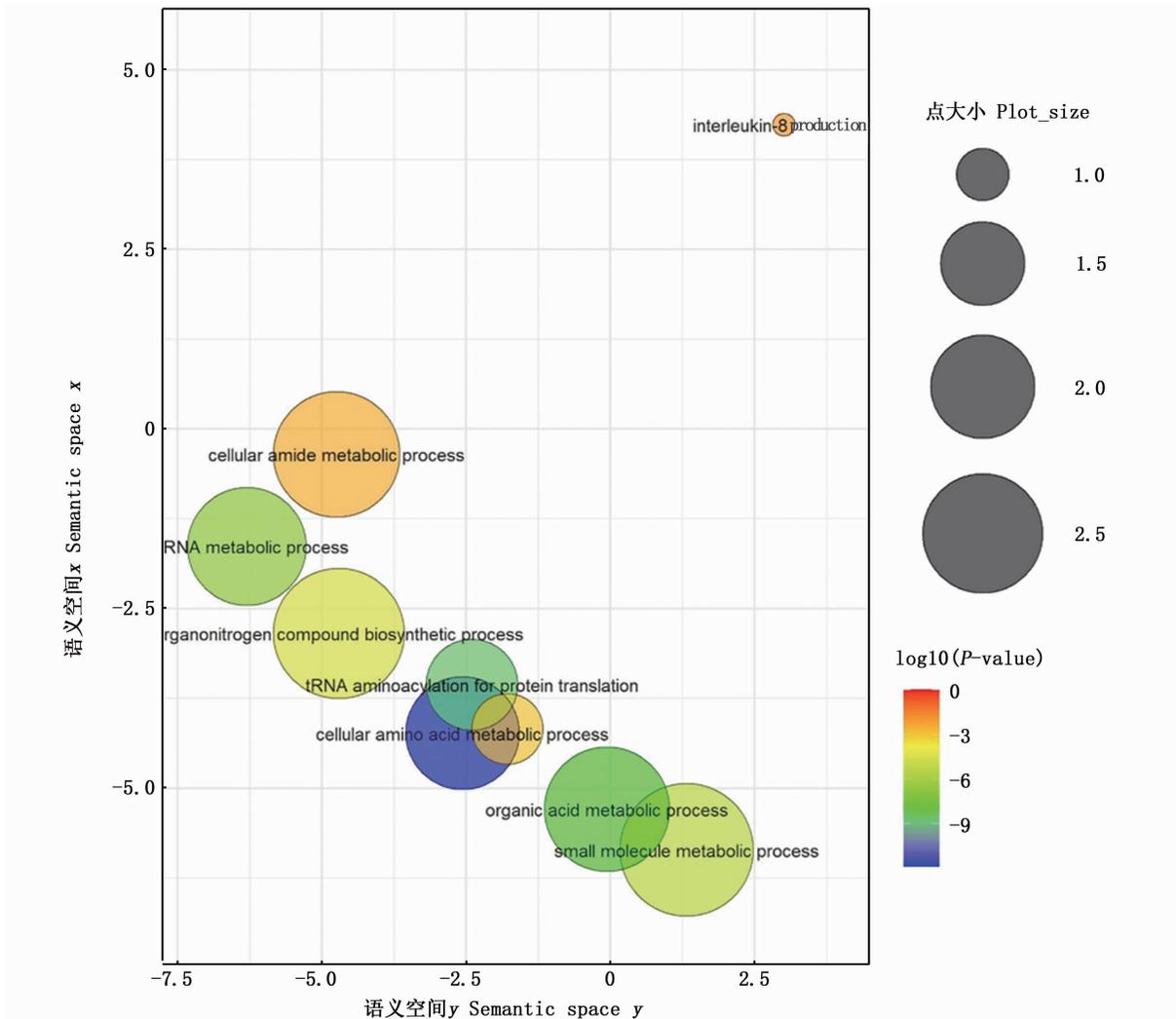
Tab. 4 Top ten differentially expressed genes in the mutant compared to the wild-type

斑马鱼基因 ID Zebrafish GeneID	对数值 $\log_2(\text{FC})$	校正 <i>P</i> Adjusted <i>P</i>	描述 Description
<i>nupr1_1</i>	3.97	2.96×10^{-42}	nuclear protein 1
<i>ppp2r4_2</i>	3.78	1.14×10^{-40}	protein phosphatase 2 phosphatase activator
<i>phb2b</i>	3.76	1.38×10^{-40}	prohibitin 2b
<i>si:ch211-214e3.5_1</i>	3.61	4.86×10^{-35}	zinc finger protein 518A
<i>si:ch211-281l24.3</i>	-3.48	1.28×10^{-35}	unknown predicted protein
<i>wvc3_1</i>	-3.55	4.27×10^{-33}	WWC family member 3
<i>ttc4_1</i>	-3.82	5.08×10^{-40}	tetratricopeptide repeat domain 4
<i>LOC100535170</i>	-3.89	1.54×10^{-39}	a non-coding RNA
<i>ppfibp1b</i>	-4.67	7.94×10^{-66}	PPFIA binding protein 1b
<i>tomm70a_1</i>	-5.90	1.03×10^{-124}	translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A

2.4 GO (Gene ontology) 富集

与野生型相比, *sst1*^{-/-} 突变体中发现 43 个显著性 GO 富集, 大部分属于生物学过程范畴, 许多与氨基酸和蛋白质的生物合成有关。例如“细胞氨基酸代谢过程”、“羧酸代谢过程”、“用于蛋白质翻译的 tRNA 氨基酰基化作用”、“酮酸代谢过程”、“tRNA 氨基酰基化过程”(图 4, 表 5)。在分

子功能方面, 蛋白质生物合成过程高度表达, 如“连接酶活性”、“氨基酰基-tRNA 连接酶活性”、“碳氧键形成的连接酶活性”、“作用于 tRNA 的催化活性”(图 5)。细胞组分差异分析主要集中在细胞核中, 如“核仁”、“前核糖体”, 再次表明了活跃的蛋白质生物合成过程。



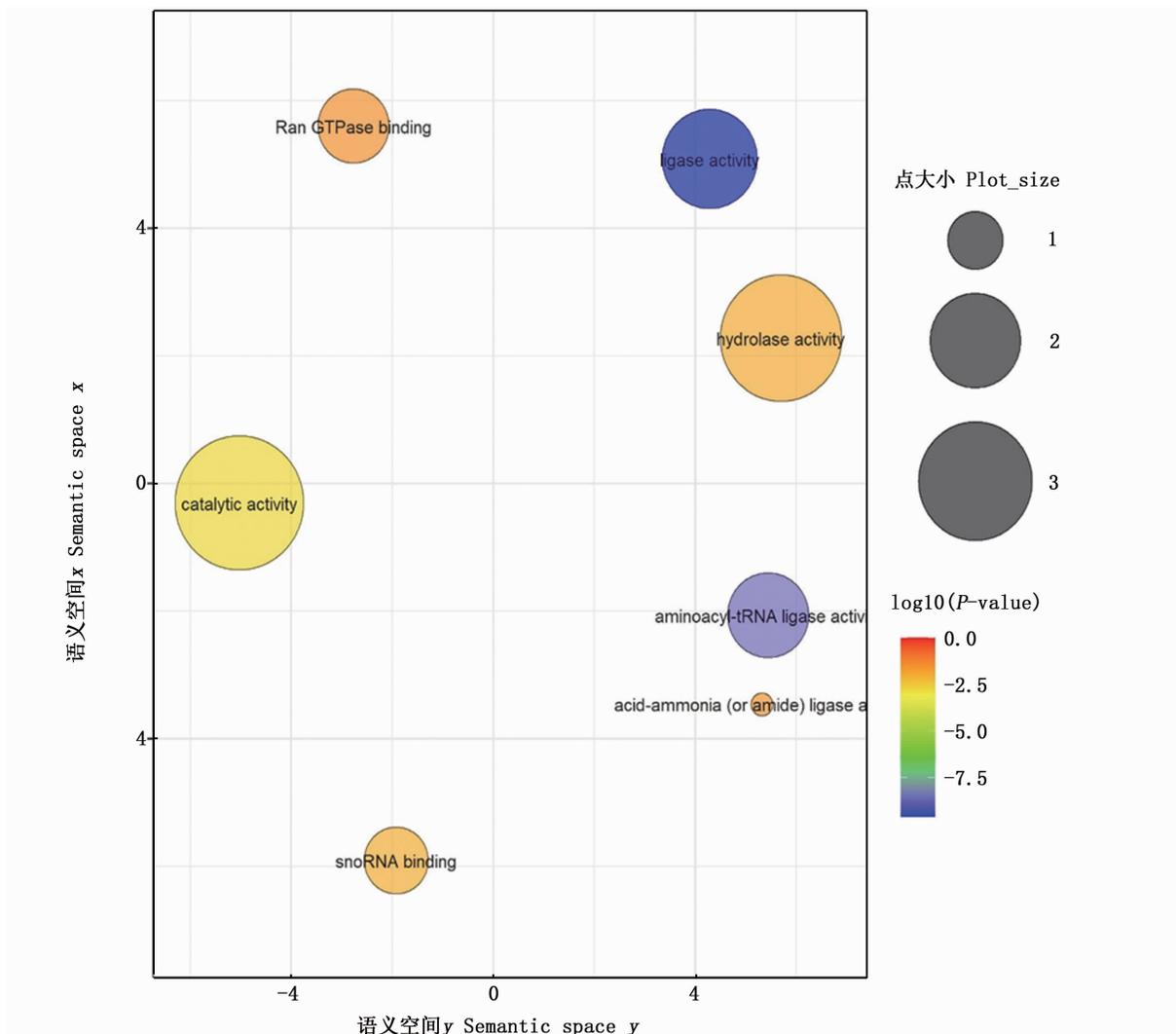
散点视图将 GO 术语可视化到一个“语义空间”中,其中相似的术语放在更靠近的位置。圆形颜色反映在 G:profiler 中获得的 P,大小反映了 UniProt-GOA 数据库中 GO 术语的通用性(圆形越大通用性越强)。
The scatterplot view visualizes the GO terms in a “semantic space” where the more similar terms are positioned closer together. The colour of the bubble reflects the P-value obtained in the G:profiler, while its size reflects the generality of the GO term in the UniProt-GOA database (bubbles of more general terms are larger).

图 4 *sst1*^{-/-} 突变体相对野生型生物学过程 GO 富集

Fig.4 Enriched GO Biological Process in *sst1*^{-/-} mutant compared with wild-type

表 5 *sst1*^{-/-} 突变体相对野生型差异表达基因富集程度最高的 KEGG 和 Reactome 通路
Tab.5 Enriched KEGG and Reactome pathways of differentially expressed genes with highest probability in *sst1*^{-/-} mutant compared with wild-type

项目 Item	序列号 ID	校正 P Corrected P
KEGG		
氨酰 t-RNA 合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	dre00970	1.90×10^{-11}
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	dre00250	8.65×10^{-5}
氨基酸合成 Biosynthesis of amino acids	dre01230	1.18×10^{-3}
代谢途径 Metabolic pathways	dre01100	4.99×10^{-3}
类固醇合成 Steroid biosynthesis	dre00100	3.76×10^{-2}
精氨酸合成 Arginine biosynthesis	dre00220	3.76×10^{-2}
真核生物核糖体合成 Ribosome biogenesis in eukaryotes	dre03008	4.61×10^{-2}
Reactome		
细胞核和细胞液 rRNA 加工 rRNA Processing in the nucleus and cytosol	R-DRE-8868773	4.45×10^{-4}
rRNA 加工 rRNA processing	R-DRE-72312	4.45×10^{-4}
细胞核和细胞液主要 rRNA 加工途径 Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol	R-DRE-6791226	4.45×10^{-4}



散点视图将 GO 术语可视化到一个“语义空间”中,其中相似的术语放在更靠近的位置。圆形颜色反映在 G:profiler 中获得的 P ,大小反映了 UniProt-GOA 数据库中 GO 术语的通用性(圆形越大通用性越强)。

The scatterplot view visualizes the GO terms in a “semantic space” where the more similar terms are positioned closer together. The colour of the bubble reflects the P -value obtained in the G:profiler, while its size reflects the generality of the GO term in the UniProt-GOA database (bubbles of more general terms are larger).

图 5 $sst1^{-/-}$ 突变体相对野生型分子功能 GO 富集

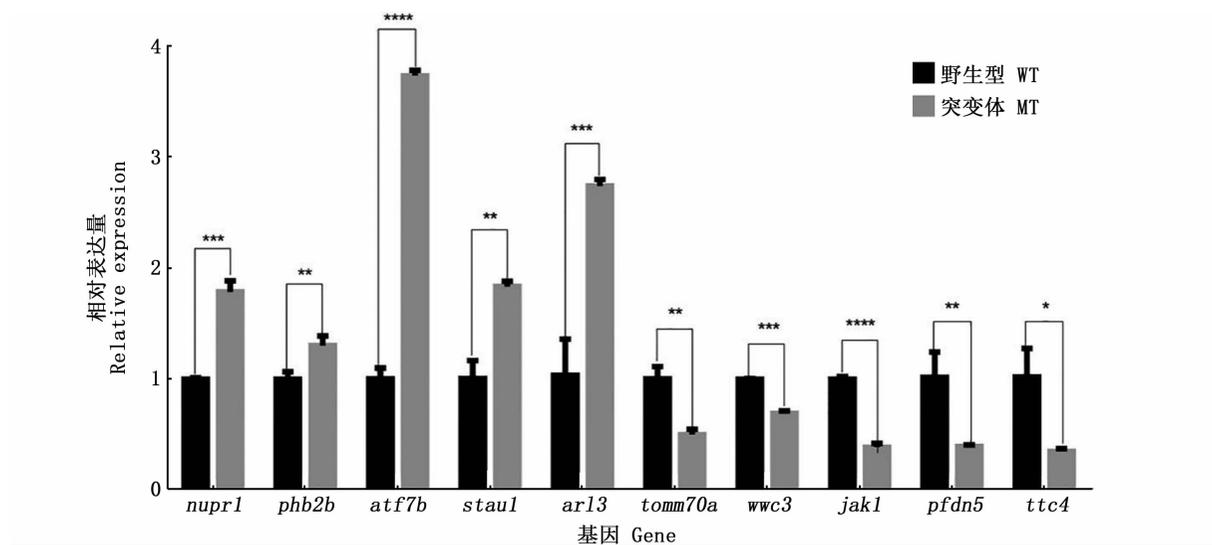
Fig. 5 Enriched GO Molecular Function in differentially expressed genes of $sst1^{-/-}$ mutant compared with wild-type

2.5 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 与 Reactome 通路分析

KEGG 通路富集分析显示,差异基因主要与代谢通路、生物合成和氨基酸合成过程相关,包括“氨酰-tRNA 生物合成”、“代谢通路”、“氨基酸生物合成”、“丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢”、“精氨酸生物合成”和“真核生物核糖体合成”。其中富集程度最高的 Reactome 通路为核糖体 RNA 加工相关(表 5)。

2.6 荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证

为验证转录组结果,分别随机选取 5 个显著上调和下调的差异表达基因进行 RT-qPCR 验证。RT-qPCR 验证结果(图 6)显示,与野生型相比,突变体中 *nupr1*、*phb2b*、*atf7b*、*staul*、*arl3* 基因 mRNA 表达水平上调, *tomm70a*、*wvc3*、*jak1*、*pfdn5*、*ttc4* 基因 mRNA 表达水平下调,其变化趋势与转录组测序分析结果一致。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 具有显著统计学差异,无显著性差异未显示。
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ represents statistical significance, no significant difference is not shown.

图 6 野生型和突变体相关基因表达量变化
 Fig.6 Changes of gene expression levels in wild type and mutant

2.7 6 月龄野生型和突变体体质量体长分析

转录组结果表明,与野生型相比,突变体中发现了两个显著下调的 *igf* (insulin like growth factor, *igf*) 结合蛋白差异表达基因 *igfbp1a* 和

igfbp5a。*igf* 是调节鱼类生长的关键因子,因此对 6 月龄野生型和突变体体质量及体长进行分析,结果发现,与野生型相比,突变体体长略微降低,体质量略微升高,但均无显著性差异(图 7)。

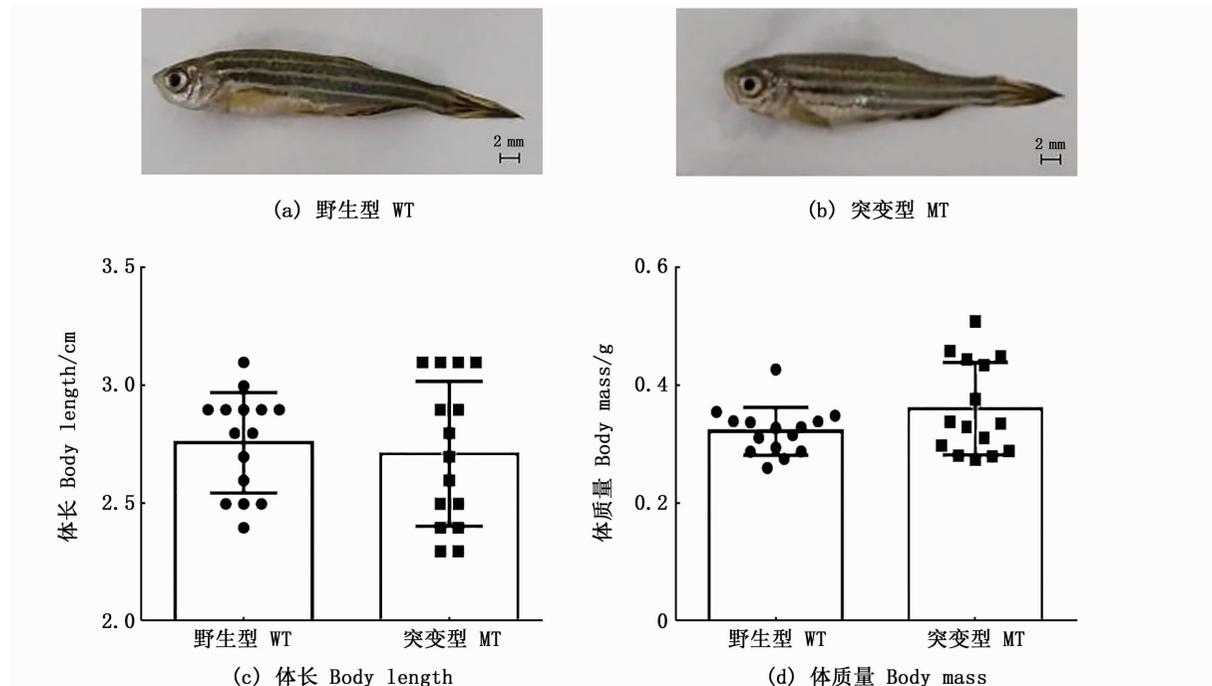


图 7 6 月龄野生型和突变体体质量体长分析 (n = 15)
 Fig.7 Body length and body mass analysis of 6-month-old wild type and mutant fish (n = 15)

3 讨论

sst1 基因突变导致 6 dpf 仔鱼的基因表达谱发生显著变化,改变了多种生物学进程和生化途径,其中大量的差异表达基因与代谢相关,尤其是蛋白质的生物合成。与野生型相比,*sst1*^{-/-}突变体中出现 858 个差异表达基因,且有 58% 的基因表达下调。与野生型相比,*sst1*^{-/-}突变体表达差异最大的 10 个基因中,有 4 个基因显著上调,其中一些与细胞周期调节相关,例如核蛋白 1 (nuclear protein 1, *nupr1*)^[22]、蛋白磷酸酶 2 磷酸酶激活剂 (protein phosphatase 2 phosphatase activator, *ptpa*)^[23]、抗增殖蛋白 2b (prohibitin 2b, *phb2b*)^[24]。这表明 *sst1* 基因缺失后,生长抑素对生长的抑制作用降低,细胞分裂活动增强。下调基因进一步验证了这一结论,包括抑制细胞增殖和促进细胞凋亡基因 (WWC family member 3, *wuc3*)^[25]、细胞周期和肿瘤抑制因子 (tetratricopeptide repeat domain 4, *ttc4*)^[26]。有研究^[27]表明,*nupr1* 基因的缺失可以防止葡萄糖耐受不良,并且幼年 *sst1* 缺失小鼠 (*Mus musculus*) 的糖耐受能力低于成年小鼠^[28]。

GO 富集分析表明,*sst1*^{-/-}突变体与野生型相比,连接酶活性、tRNA 合成活性、氨基酸、蛋白质和核糖体代谢过程以及核仁和前核糖体的细胞定位等方面高度富集,这在 KEGG 和 Reactome 通路富集中得到进一步证实,例如 tRNA 生物合成、氨基酸生物合成和核糖体合成与 rRNA 加工出现高度富集。

研究表明,*sst1*^{-/-}突变体代谢通路高度富集,这一发现与在鱼类中生长抑素刺激脂肪降解和碳水化合物分解的研究一致^[29]。例如,在大鼠 (*Rattus norvegicus*) 和虹鳟鱼中,生长抑素的灌注引起肝脏三酰甘油脂肪酶活性的变化,进而导致血浆脂肪酸水平的改变^[30-31]。生长抑素在小鼠脑脂质代谢中起着重要的作用,可降低 cAMP (cyclic adenosine monophosphate) 和甘油三酯脂肪酶的含量^[32]。除此之外,生长抑素类似物对内脏血流和葡萄糖稳态也具有重要影响^[33]。

生长激素 (growth hormone, GH) 主要通过 IGF (insulin like growth factor, IGF) 调节鱼类肌肉生长^[34]。本研究结果与已有鱼类中 SST 调节 GH-IGF 轴的观点一致^[35]。然而与野生型相比,

突变体中只发现了 2 个显著下调的 IGF 结合蛋白差异表达基因 *igfbp1a* 和 *igfbp5a*。IGF 结合蛋白结合 IGF 后,具有增加半衰期,调节与不同组织受体的结合,抑制有丝分裂、分化和存活等功能^[36]。但是本研究没有发现 GH 的差异表达,对 6 月龄野生型和 *sst1* 突变体体质量体长分析初步结果显示,野生型和 *sst1* 突变体体质量和体长之间并无显著差异 (图 7)。但是之前的报道^[14]表明,*sst4* 基因缺失显著增加 45 dpf、50 dpf 和 55 dpf 突变体的体质量及体长。这表明其他 *sst* 基因可能在斑马鱼生长中发挥着特有的作用。最后,与野生型相比,在突变体中没有发现任何 *sst1* 转录本的差异表达,表明不存在 *sst1* 基因的反馈调节机制。

综上所述,*sst1* 基因突变导致 SST1 蛋白失活,导致 6 dpf 斑马鱼仔鱼基因表达发生显著变化。*sst1* 基因突变显著改变了代谢基因,特别是与氨基酸、tRNA 和核糖体生物合成相关基因的变化,但是活跃的蛋白质合成过程并未引起 6 月龄野生型和 *sst1* 突变体体质量体长的变化,这为进一步筛选 *sst* 基因在斑马鱼生长中的特定功能提供参考。并且 *sst1* 基因缺失导致代谢过程更加活跃,尤其是蛋白质合成。这将为研究 *sst1* 基因在代谢中功能提供参考,为进一步解析生长抑素基因家族在鱼类中的功能奠定基础。

参考文献:

- [1] BRAZEAU P, VALE W, BURGUS R, et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone[J]. *Science*, 1973, 179(4068): 77-79.
- [2] NELSON L E, SHERIDAN M A. Regulation of somatostatins and their receptors in fish [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 142(1/2): 117-133.
- [3] ARTINIAN J, LACAILE J C. Disinhibition in learning and memory circuits: new vistas for somatostatin interneurons and long-term synaptic plasticity [J]. *Brain Research Bulletin*, 2018, 141: 20-26.
- [4] TOSTIVINT H, GAILLARD A L, MAZAN S, et al. Revisiting the evolution of the somatostatin family: already five genes in the gnathostome ancestor [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 279: 139-147.
- [5] TOSTIVINT H, QUAN F B, BOUGEROL M, et al. Impact of gene/genome duplications on the evolution of the urotensin II and somatostatin families [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 188: 110-117.

- [6] PRADAYROL L, JÖRNVALL H, MUTT V, et al. N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28[J]. FEBS Letters, 1980, 109(1): 55-58.
- [7] ANDREWS P C, POLLOCK H G, ELLIOTT W M, et al. Isolation and characterization of a variant somatostatin-14 and two related somatostatins of 34 and 37 residues from lamprey (*Petromyzon marinus*) [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(30): 15809-15814.
- [8] LIU Y, LU D Q, ZHANG Y, et al. The evolution of somatostatin in vertebrates [J]. Gene, 2010, 463(1/2): 21-28.
- [9] GAHETE M D, CORDOBA-CHACÓN J, DURAN-PRADO M, et al. Somatostatin and its receptors from fish to mammals [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010, 1200(1): 43-52.
- [10] REISINE T, BELL G I. Molecular biology of somatostatin receptors[J]. Endocrine reviews, 1995, 16(4): 427-442.
- [11] YUNKER W K, CHANG J P. Somatostatin-14 actions on dopamine- and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-evoked Ca^{2+} signals and growth hormone secretion[J]. Journal of Neuroendocrinology, 2004, 16(8): 684-694.
- [12] WANG B, QIN C B, ZHANG C, et al. Differential involvement of signaling pathways in the regulation of growth hormone release by somatostatin and growth hormone-releasing hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2014, 382(2): 851-859.
- [13] 朱哲, 胡沛男, 李伟明, 等. 利用 CRISPR/Cas9 构建斑马鱼 *tbx20* 基因突变体及其功能分析[J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(1): 1-9.
- ZHU Z, HU P N, LI W M, et al. Zebrafish *tbx20* gene knockout using CRISPR/Cas9 system and its related functions analysis[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2019, 28(1): 1-9.
- [14] SUI C C, CHEN J, MA J, et al. Somatostatin 4 regulates growth and modulates gametogenesis in zebrafish [J]. Aquaculture and Fisheries, 2019, 4(6): 239-246.
- [15] AFGAN E, BAKER D, BATUT B, et al. The galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses; 2018 update[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W537-W544.
- [16] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements [J]. Nature Methods, 2015, 12(4): 357-360.
- [17] PERTEA M, KIM D, PERTEA G M, et al. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown[J]. Nature Protocols, 2016, 11(9): 1650-1667.
- [18] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. Genome Biology, 2014, 15(12): 550.
- [19] RAUDVERE U, KOLBERG L, KUZMIN I, et al. G:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update) [J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(W1): W191-W198.
- [20] SUPEK F, BOŠNJAK M, ŠKUNCA N, et al. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms [J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21800.
- [21] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. Genome Research, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [22] CANO C E, HAMIDI T, SANDI M J, et al. Nupr1: the swiss-knife of cancer [J]. Journal of Cellular Physiology, 2011, 226(6): 1439-1443.
- [23] ZOLNIEROWICZ S. Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways [J]. Biochemical Pharmacology, 2000, 60(8): 1225-1235.
- [24] COATES P J, JAMIESON D J, SMART K, et al. The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan [J]. Current Biology, 1997, 7(8): 607-610.
- [25] GENEVET A, WEHR M C, BRAIN R, et al. Kibra is a regulator of the Salvador/Warts/Hippo signaling network [J]. Developmental Cell, 2010, 18(2): 300-308.
- [26] CREVEL G, BENNETT D, COTTERILL S. The human TPR protein TTC4 is a putative Hsp90 co-chaperone which interacts with CDC6 and shows alterations in transformed cells [J]. PLoS One, 2008, 3(3): e0001737.
- [27] BARBOSA-SAMPAIO H C, DRYNDA R, LIU B, et al. Reduced nuclear protein 1 expression improves insulin sensitivity and protects against diet-induced glucose intolerance through up-regulation of heat shock protein 70 [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2015, 1852(5): 962-969.
- [28] ZEYDA T, HOCHGESCHWENDER U. Null mutant mouse models of somatostatin and cortistatin, and their receptors [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2008, 286(1/2): 18-25.
- [29] KAO Y H, YOUSON J H, HOLMES J A, et al. Effects of somatostatin on lipid metabolism of larvae and metamorphosing landlocked sea lamprey, *Petromyzon marinus* [J]. General and Comparative Endocrinology, 1998, 111(2): 177-185.
- [30] BYRNE R H, NOMPLEGGI D J, RAMEY E R, et al. Studies on the extrapancreatic metabolic effects of somatostatin [J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1977, 155(4): 507-510.
- [31] OGIHARA M, UI M. Effects of somatostatin on liver glycogen and fat metabolism *in vivo* [J]. Japanese Journal of Pharmacology, 1984, 34(3): 313-318.
- [32] CATALAN R E, MARTINEZ A M, MIGUEL B G, et al. Somatostatin effects on the cyclic AMP system and lipid metabolism in mouse brain [J]. Neurochemical Research,

- 1986, 11(4): 497-504.
- [33] MAZZIOTTI G, FLORIANI I, BONADONNA S, et al. Effects of somatostatin analogs on glucose homeostasis: a metaanalysis of acromegaly studies [J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2009, 94(5): 1500-1508.
- [34] FUENTES E N, VALDES J A, MOLINA A, et al. Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone--insulin-like growth factor system [J]. General and Comparative Endocrinology, 2013, 192: 136-148.
- [35] KLEIN S E, SHERIDAN M A. Somatostatin signaling and the regulation of growth and metabolism in fish[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2008, 286(1/2): 148-154.
- [36] ALLARD J B, DUAN C M. IGF-binding proteins: why do they exist and why are there so many? [J]. Frontiers in Endocrinology, 2018, 9: 117.

Transcriptome sequencing analysis of *somatostatin 1* gene mutation in zebrafish larvae

ZHAO Wenting¹, CHEN Jie¹, LOURO Bruno², CAO Lei¹, MA Jing¹, MARTINS Rute S. T.², CANARIO Adelino V. M.^{1,2}

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. CCMAR-Centre of Marine Sciences, University of the Algarve, Gambelas Campus 8005-139 Faro, Portugal)

Abstract: Somatostatin (SST), is a kind of neurohormone with key roles in regulating growth and metabolism in all vertebrates. In zebrafish and other fishes, SST peptides are encoded by six genes, and *sst1* exists in all vertebrates and is the most evolutionarily conservative. Here, we explored *sst* functions through a transcriptomic comparison of 6 days post fertilization (dpf) zebrafish *sst1*^{-/-} mutants generated by CRISPR/Cas9 gene-editing technology and their wild type counterparts. It is found that several biological processes and biochemical pathways were modified in *sst1*^{-/-} zebrafish. The mutant had 354 significantly up-regulated and 504 significantly down-regulated genes. Gene ontology (GO) enrichment analysis showed that most of the differentially expressed genes were related to the biosynthesis of amino acids and proteins. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment indicated metabolic pathways as well as pathways related to amino acid biosynthesis, aminoacyl-tRNA biosynthesis, ribosome biogenesis and rRNA processing were highly represented in the mutant, indicating a more active protein biosynthesis and metabolism. The results of RT-qPCR illustrated that the mRNA expression trends of 10 randomly selected genes were consistent with the results of transcriptome sequencing analysis, indicating that the transcriptome results were accurate and reliable. There was no significant difference in body weight and body length between 6-month-old mutant and wild-type. The results provide a foundation for further exploring the potential functions of the somatostatin gene family.

Key words: *Somatostatin1*; zebrafish; metabolism; protein biosynthesis