

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220620001

http://www.yykxjz.cn/

练诗雅, 王亚冰, 王倩, 陈润, 岳彦峰, 苏志星, 李云凯, 彭士明. 银鲳 3 个营养代谢相关基因的克隆、表达及摄食水母对其表达模式的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(6): 58–73

LIAN S Y, WANG Y B, WANG Q, CHEN R, YUE Y F, SU Z X, LI Y K, PENG S M. Cloning and expression of three *Pampus argenteus* genes and the effects of jellyfish feeding on their expression patterns. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(6): 58–73

银鲳 3 个营养代谢相关基因的克隆、表达 及摄食水母对其表达模式的影响*

练诗雅^{1,2} 王亚冰¹ 王倩¹ 陈润^{1,2}
岳彦峰¹ 苏志星¹ 李云凯³ 彭士明^{1①}

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;
3. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306)

摘要 本研究基于转录组学的分析结果,克隆分析了银鲳(*Pampus argenteus*)二肽酶(dehydropeptidase, *dpl*)、羧肽酶 A(carboxypeptidases, *cpa2l*)和磺基转移酶(sulfotransferase, *sult2*) 3 个营养代谢相关基因,并探讨了其在消化吸收水母(Scyphozoa)过程中发挥的功能。通过 RACE 技术克隆获得了银鲳 *dpl*、*cpa2l* 和 *sult2* 基因的 cDNA 全长序列。*dpl* 基因全长 2 522 bp, 包含 1 个 1 272 bp 的开放阅读框(ORF), 含有 1 个由 23 个氨基酸组成的信号蛋白肽和 1 个典型的酰胺水解酶超家族的结构域。*cpa2l* 基因全长 1 421 bp, ORF 长 1 260 bp, 含有 1 个由 16 个氨基酸组成的信号蛋白肽和 1 个典型的 M14 金属羧肽酶家族的结构域。*sult2* 基因全长 1 834 bp, ORF 长 714 bp, 含有 1 个典型的磺基转移酶家族的结构域。银鲳 *Dpl*、*Cpa2l* 和 *Sult2* 与蓝鳍金枪鱼(*Thunnus maccoyii*) 同源性最高, 系统进化树结果也显示, 银鲳 *dpl*、*cpa2l* 和 *sult2* 与蓝鳍金枪鱼对应基因聚在一个分支上, 亲缘关系最近。运用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测了 *dpl*、*cpa2l* 和 *sult2* 基因在不同组织中的表达水平及摄食水母对 3 个基因不同组织中表达规律的影响。结果显示, 银鲳 *dpl* 基因在肝脏中表达量最高($P<0.05$), 与未摄食水母组相比, *dpl* 基因在摄食水母组的脑和鳃中表达量均极显著增加($P<0.01$), 在中肠和肾脏中显著增加($P<0.05$), 而在肌肉中显著下降($P<0.05$)。 *cpa2l* 基因在未摄食水母组的中肠中表达量最高, 而在摄食水母组的肾脏中表达量最高($P<0.05$), 与未摄食水母组相比, 摄食水母组 *cpa2l* 基因在肝脏中的表达量极显著增加($P<0.01$), 而在中肠和肌肉中却极显著下降($P<0.01$)。 *sult2* 基因在肝脏中表达量最高($P<0.05$), 与未摄食水母组相比, *sult2* 基因在摄食水母组的中肠、脑、鳃、肝脏和肾脏中表达量显著增加($P<0.05$)。研究表明, *dpl*、*cpa2l* 和 *sult2* 基因在银鲳摄食水母后机体营养物质的消化吸收和代谢过程中起重要的调节作用, 基于摄食水母后 3 个基因组织表达模式的比较分析, 推测 *dpl* 主要参与调控消化吸收和组织中营养素沉积的过程, *cpa2l* 主要参与调控肝脏中营养代谢的过程, 而 *sult2* 可能在整个消化吸收和代谢过程中均起到重要的调控作用。

关键词 银鲳; 营养代谢; 基因; 水母; 表达模式

* 国家自然科学基金面上项目(31772870)、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系和中央级公益性科研院所基本科研业务费(2420-2019)共同资助。练诗雅, E-mail: 2100213030@qq.com

① 通信作者: 彭士明, 研究员, E-mail: shiming.peng@163.com

收稿日期: 2022-06-20, 收修改稿日期: 2022-07-26

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)06-0058-16

银鲳(*Pampus argenteus*)是我国主要的海产经济鱼类之一(郑迪等, 2021)。水母(Scyphozoa)属刺胞动物门(Cnidaria), 是海洋生态系统中重要的浮游生物, 但由于其具有水母毒素, 且含有 95%左右的水分, 高价值的营养成分含量低, 而鱼类对蛋白质的需求水平比畜禽更高, 所以, 长期以来水母在海洋食物链中都被忽视(Doyle *et al.*, 2007; Cardona *et al.*, 2012; 王万良等, 2020)。然而, Liu 等(2014)研究表明, 银鲳偏好摄食水母, 其日摄食海月水母(*Aurelia aurita*)量超出自身体重的 10 余倍。本课题组使用碳氮同位素技术对我国东海海域的野生银鲳的食性进行分析发现, 该海域的野生银鲳摄食水母的机率高达 54%。同时, 彭士明等(2011)在对银鲳的日常养殖过程中发现, 有多种食物时, 银鲳会选择水母作为其首要食物来源。但银鲳摄食水母(水分高且蛋白质含量较低的胶状食物)并将其消化吸收的相关生理机制尚不清楚。

二肽酶(dehydropeptidase, dp)也称为膜或微粒体二肽酶, 是一种水解二肽的膜结合糖蛋白(Habib *et al.*, 1996)。已证实 dp 基因参与细胞周期进程、DNA 复制、凋亡、肿瘤抑制、胚胎外发育和胚胎存活、肌肉生长、中心粒复制以及神经调节等生理过程(Hitchens *et al.*, 2003; Kohn *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2001)。羧肽酶(carboxypeptidases, cpa)是催化水解末端含羧基的氨基酸的水解酶(Kim *et al.*, 2012), 参与多种生物过程, 包括食物消化、神经肽成熟以及细胞外信号因子的调节等(Josep *et al.*, 2000; Arolas *et al.*, 2007)。胞质磺基转移酶(sulfotransferase, sult)是催化磺基从 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸盐(PAPS)转移到各种含羟基或氨基的化合物(Reznik *et al.*, 2001; Mulder *et al.*, 1990; Jeffery, 1993)。这些化合物硫酸盐化后可用于膳食、治疗和环境外源性物质的解毒, 也可调节内源性分子的水平 and 活性(Kauffman, 1994)。本研究将对银鲳 dp、cpa 和 sult 基因进行克隆, 分析其编码的氨基酸序列, 研究摄食水母对其在银鲳体内不同组织表达模式的影响, 以期为银鲳消化吸收水母的过程机制研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

将 200 条健康的银鲳[(151.1±4.6) g]饲养于 2 个 8 m×4 m×1.8 m 水泥池中, 每个水泥池 100 条, 保持

水泥池内温度为 25 °C、盐度为 20~22。根据本课题组前期的研究成果配制银鲳的人工配合饲料, 分别于 08:00 和 17:00 投喂 2 次, 每天换水 1 次(07:30)。驯养 2 周后, 随机选取 1 个水泥池, 除投喂人工配合饲料, 每天还额外投喂银鲳体重 3%的新鲜水母[海蜇(*Rhopilema*), 伞盖直径为 3~5 cm], 实验周期为 20 d (基于转录组学的时空表达分析发现, 实验维持 20 d 后主要营养相关基因的表达基本趋于稳态)。实验结束后, 从每个水泥池中分别选取 36 尾鱼, 经丁香酚(国药集团化学试剂有限公司)麻醉(100 mg/L)后, 解剖采集肠、脑、鳃、肝脏、肾脏和肌肉组织, 每 6 尾鱼的同一组织合并后放入 1 个无菌管中, 所有样品经液氮速冻后, 置于-80 °C 保存。

1.2 银鲳总 RNA 的提取

银鲳各个组织的混合样品总 RNA 提取按照 RNAiso Plus (Total RNA 提取试剂)试剂盒(TaKaRa, 大连)说明书操作, 使用酚-氯仿(国药集团化学试剂有限公司)混合抽提去除蛋白, 使用 GenovaNano 测定总 RNA 的浓度和纯度, 观察 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比率确定 RNA 的完整性, 并用琼脂糖凝胶电泳检测。

cDNA 合成根据 PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa, 大连)说明书操作步骤进行。合成后的产物置于-20 °C 冰箱保存。RACE 的 cDNA 合成按照 SMARTer RACE 5'/3' 试剂盒(Clontech, 美国)中的说明书进行。所获得的 RACE 反转录产物用于后续的 PCR 扩增, 并于-20 °C 保存。

1.3 银鲳 dp1、cpa2l 和 sult2 基因 cDNA 全长克隆

从银鲳中肠(是否摄食水母)的差异转录组文库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA736245>)中筛选得到了 dp、cpa 和 sult 基因的片段序列。将 dp、cpa 和 sult 基因序列与 NCBI 数据库比对, 该片段与鱼类的 dp1、cpa2l 和 sult2 基因具有极高的相似度。以此片段为模板, 参照引物设计原则, 使用 Primer designing tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 在线引物设计软件进行引物设计(表 1)。参照 5'/3'RACE 试剂盒中操作说明, 采用巢式 PCR 对银鲳 dp1、cpa2l 和 sult2 基因 5'/3'端序列进行克隆。PCR 程序: 95 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。

表1 本研究所用引物
Tab.1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose	GenBank No.
DP1-3'F	ACAAGACTACCAGAGGGTCTGGA	3'-RACE	
DP1-5'R	GTGTTAAGATCCACAGTGTGA	5'-RACE	
CPA2L-3'F	TGCCAGCCAATCAGATCGTCC	3'-RACE	
CPA2L-5'R	AGTCTCCAGAGCCTGCAGGCG	5'-RACE	
SULT2-3'F	AACTAACAGTGGCAGAAGCAGAG	3'-RACE	
SULT2-5'R	TGGAGACGGCCTCTCTCAAGGT	5'-RACE	
3'-RACE outer	GGTGGTGTCTGCCTGAA	3'-RACE	
3'-RACE inner	CCTGAAGGGGCACAAGAA	3'-RACE	
5'-RACE outer	ATTACCCGTTGCCTCT	5'-RACE	
5'-RACE inner	ACCACCAGCAGGCAGTTG	5'-RACE	
CCK-F	GCAAGACTCATCTCCTCCA	RT-qPCR	
CCK-R	TCCATCCAGCCCAAGTAG	RT-qPCR	
CART4-F	CACGGACCTCGTATTGGT	RT-qPCR	
CART4-R	CTGGTTTTAGGGTTCTGGTTAG	RT-qPCR	
DP1-F	TGTTGGTGTGTGTTGTTTTG	RT-qPCR	OL471350
DP1-R	CTGTGGGTCACCTCTTTTGA	RT-qPCR	
CPA2L-F	CCACCAGAGTGTCCATCC	RT-qPCR	OL471351
CPA2L-R	ACAACATCCGTTCTCCA	RT-qPCR	
SULT2-F	TACTCTGCGGTTCTCGT	RT-qPCR	OL471352
SULT2-R	CTGCCACTGTTAGTTGGTTCT	RT-qPCR	
β -actin-F	ACCCAGATCATGTTCCGAGACC	RT-qPCR	KF982333.1
β -actin-R	TGAAATCGCCGCACTGGTTG	RT-qPCR	

将上述 PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 按照胶回收试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]的说明书进行回收操作。参照质粒连接的说明书, 将纯化后的产物连接到 pMD18-T 载体上。按照说明再将已连接 PCR 产物的 pMD18-T 载体(TaKaRa, 大连)转化于感受态细胞(DH5 α)中。于过夜培养后, 根据蓝白斑规则, 挑选阳性单克隆结果进行扩增培养, 将培养好的菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.4 生物信息学分析

在 NCBI 网站上的 ORF 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)中分析 *dp1*、*cpa2l* 和 *sult2* 基因的全长 cDNA 序列(扶晓琴等, 2022; 魏威等, 2022)。对 ORF 进行 Blast 比对, 检验其相似度和一致性。运用 DNAMAN 6.0 软件进行序列拼接及序列比对分析。用 BLASTX 和 BLASTN 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)比较已知物种的 *dp1*、*cpa2l* 和 *sult2* 基因序列。使用 MEGA 5.1 软件进行系统进化树分析, 采用 Bootstrap 法重复计算 1 000 次。采用 SignalP Ver.4.0 程序[SignalP

4.0 Server (dtu.dk)]进行信号肽分裂位点分析。

1.5 摄食水母对银鲳 *dp1*、*cpa2l* 和 *sult2* 基因在不同组织中相对表达量的影响

根据银鲳 *dp1*、*cpa2l* 和 *sult2* 基因的 cDNA 序列, 在其开放阅读框内使用 Primer 5.0 在线设计实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)引物, 并用琼脂糖凝胶电泳检测目的片段的正确性。根据 1.1 所采集样品 RNA 的浓度, 分别取各组织的 1 μ g 总 RNA 作为模板进行反转录, 获得 cDNA。以 cDNA 为模板, β -actin 基因为内参基因, 用 RT-qPCR 检测 *dp1*、*cpa2l* 和 *sult2* 基因在不同组织 C_t 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析其表达模式以及摄食水母对其表达模式的影响(Livak *et al*, 2001; 扶晓琴等, 2022; 魏威等, 2022)。使用表 1 中的引物进行扩增, 反应体系为 25 μ L, 包括 2 \times Ultra SYBR Mix Ture Supermix 12.5 μ L (康为世纪生物科技股份有限公司)、上下游引物各 0.5 μ L、ddH₂O 10.5 μ L、cDNA 模板 1 μ L。RT-qPCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环; 65~95 $^{\circ}$ C, 增量 0.5 $^{\circ}$ C (绘制熔解曲线) 5 s。

B 1 gcaggtattaagagactggaagaagcggagcctgacgcacttctaacagtttgacgtac
 1 M N R L W L L L V L V A A A K A E R
 61 agacgagATGAATAGACTCTGGCTGCTGTTGGTGTCTGGCTGCGGCCAAAGCTGAGAG
 19 V F T G D Q V I R V N V E S E E Q I Q R
 121 AGTCTTCACTGGAGATCAGGTAATCAGGGTCAATGTGGAGTCTGAGGAACAGATCCAACG
 39 L Q A L E T E E E W E L D F W L H P V S
 181 CCTGCAGGCTCTGGAGACTGAAGAGGAGTGGGAGCTGGACTTCTGGCTCCACCCCGTCTC
 59 T E L P V D I R V P S S S L S A V K E Y
 241 CACTGAGCTTCTGTTGACATCAGAGTACCCAGCTCCAGTCTGAGCGCTGTGAAGGAGTA
 79 L H A H N I R F S I M I N D L Q E H L D
 301 CCTCCATGCCACAACATCCGCTTCTCCATCATGATTAACGACCTTCAGGAGCATCTCGA
 99 E E K A E M E K N R M K E R S T S S F N
 361 TGAGGAGAAAGCTGAGATGGAGAAGAACCGGATGAAGGAGCGCAGCACCAGCAGCTTCAA
 119 F G A Y H R L E T I Y S W M D T L V A Q
 421 CTTTGGAGCTTATCATCGTCTGGAGACAATCTACAGCTGGATGGACACTCTGGTGGCGCA
 139 Y P K L V T K Q E I G K S Y E N R P M Y
 481 GTACCCTAAACTGGTCACAAAGCAGGAAATCGGGAAATCCTATGAAAACAGGCCCATGTA
 159 V L K F S T G G Y N R P A I W I D T G I
 541 TGTGCTCAAGTTCAGCACTGGAGGCTACAATCGTCCTGCTATCTGGATCGACACCGGTAT
 179 H S R E W V S Q A T G V W T A N K I A T
 601 CCACTCCAGAGAATGGGTGTCTCAGGCTACCGGAGTGTGGACAGCCAACAAGATCGCCAC
 199 D Y G T D A S L T S L L N T M D I Y M L
 661 TGATTATGGTACCGACGCTTCCCTGACGTCTCTTCTGAACACCATGGACATTTACATGCT
 219 I L A N P D G Y A Y S H T N D R M W R K
 721 GATCCTGGCCAACCCTGACGGCTACGCTTACAGCCACACCAATGATCGTATGTGGCGTAA
 239 T R S K N S G S F C R G V D P N R N W N
 781 GACTCGCTCCAAGAACTCGGGCTCCTTTTGGCGTGGAGTCGATCCCAACAGGAACTGGAA
 259 A G F G G A G A S R N P C S D A Y H G P
 841 TGCAGGCTTTGGTGGCGCTGGTGCCAGTAGGAACCCCTGCTCTGACGCCTACCACGGCCC
 279 S A H S E I E V K N V V N L I Q S H G N
 901 CTCAGCTCACTCTGAGATTGAGGTAAAGAACGTGGTGAACCTGATCCAAAGCCACGGCAA
 299 F K S F I S V H A Y S Q L L M Y P Y G Y
 961 CTTCAAGTCCTTCATCTCTGTCCACGCCTACTCCCAGCTGCTCATGTATCCCTACGGCTA
 319 S C K D A P D Q P E L D S V G R A A V T
 1021 TTCTTGCAAAGATGCGCCGATCAGCCTGAGCTGGACTCAGTTGGCAGAGCTGCAGTGAC
 339 K L T S L Y G T R Y K V G S I C N I I Y
 1081 CAACTCACTTCTCTATGGCACCAGATAACAAGTTGGAAGCATCTGCAACATCATCTA
 359 Q A S G G S I D W S Y D Q G I K Y S F A
 1141 TCAAGCCAGTGGAGGCAGCATTGACTGGAGCTATGACCAGGGCATCAAGTACTCGTTTGC
 379 F E L R D T G R Y G F V L P A N Q I V P
 1201 CTTTGGAGCTGAGGGACTGGTTCGCTACGGTTTCGTCCTGCCAGCCAATCAGATCGTCCC
 399 T A S E T W L A L K H I M E Y V H E H A
 1261 CACCGCTCCGAGACGTGGCTGGCCCTGAAGCACATCATGGAGTACGTCCACGAGCACGC
 419 Y *
 1321 TTATTGATcgactcgtctttatcattcgacaccgatgtatgatatttgactacaacgctg
 1381 actaataaatacatgaatacaggcttagtctgtgaaaaaa

C 1 tcaaaataaaccgtaatccttttgtattgacaaaatagctggtaaaatgaataaatcaatc
 61 aatcaatcatgaatgacataaaaaaaaaaagtaattatttggttgcctcaagggcagttc
 121 aatcacaattttaaaaaatgagaaattagaaagtattcgtgggtactgagaatggacttta
 181 gatcatcacgctgattggtttatatatagcagagagataagagttttacaaaggctgaga
 241 atataaatcaataaaaataagtcatttagtgaactgcaaatttcagagaagctctcgggtc
 1 M Q E I V P L I M S G G D
 301 tttggttcaggtactacttggATGCAGGAGATTGTTCCCTCTGATCATGAGTGGAGGAGAT
 14 P A S V E T L L N W K R V P W L E V H Q
 361 CCAGCATCTGTTGAGACTCTTCTTAACTGGAAGCGTGTTCCTGGCTGGAGGTGCATCAG
 34 T S S L N L E E R P S P R M F A T H F H
 421 ACCAGCAGCCTTAACCTTGAAGAGAGGCCGTCTCCACGCATGTTTGCTACACACTTCCAC
 54 Y S M M P P S F F K V K P K V I Y V M R
 481 TACAGCATGATGCCACCGTCCTTCTTCAAAGTTAAGCCAAAAGTCATCTATGTCATGAGA
 74 N P K D V F T S S F H Y Y G I T N F L V
 541 AATCCCAAGGATGTGTTTACATCTTCCCTCCATTATTATGGAATAACCAACTTTTTGGTC
 94 N P G S Q S E F L H K F L D G K V M F G
 601 AACCCAGGCTCACAGAGCGAGTTCCTGCACAAGTTCCTTGATGGAAAAGTTATGTTTGGC
 114 S W F D H V K G W L N A D D K E R I M Y
 661 TCATGGTTTGATCATGTAAAGGGCTGGCTGAACGCTGACGATAAGGAGAGAATAATGTAC
 134 I S Y E E M I M D L K D S V A R I T Q F
 721 ATCTCCTATGAAGAAATGATAATGGACCTGAAGGACTCTGTGGCCAGAATCACTCAGTTC
 154 L E K S L D S E V M E R I A D R C V F K
 781 TTGGAGAAATCTCTGGACTCTGAGGTGATGGAGAGGATAGCAGACCGATGTGTGTTCAAG
 174 N M K Q N N M S N Y S A V P R E F M D Q
 841 AACATGAAGCAGAACAACATGTCAAATACTCTGCGGTTCCCTCGTGAATTCATGGACCAG
 194 T K S E F L R K G I A G D W K N Q L T V
 901 ACAAAGTCTGAATTTCTCAGGAAAGGAATCGCCGGAGACTGGAAGAACCAACTAACAGTG
 214 A E A E Y F D S V Y K D K M K D V K Y A
 961 GCAGAAGCAGAGTACTTTGATTCTGTTTACAAAGACAAGATGAAAGATGTCAAATATGCA
 234 F K W D *
 1021 TTAAATGGGATTAaagaacaagttcaaactatgactgaagcagagttatacacgggtg
 1081 tataaggggggtttatgtccctacacttctgcaccctccacagagcctgaaatacagcgag
 1141 gagtttacttttctgctccagatgatactatcattgtcacatatcccaagtcaggtgagtat
 1201 tcaactgttacttgtattgaatattcactttagaacataagagcctaacaatctacatgt
 1261 tgtaggctaatttgtttttgaaatataccatctgaaatttttttgactgtccttgaaatga
 1321 aatgtcaaaacactggctacagcattcacaaaaactggagagggcagatgtagtatgaat
 1381 ggaacttgacaaacgaatagtttctgtatcatataatggtagtggtggtattcagatcct
 1441 tcagatgtttcccgcattcaaaatgagagattttgggcaaaatgagcttaacatcaagg
 1501 caaaagtagtcatacgttaaccgttataaataatattaagtaggttataaaatagtagac
 1561 tggataatgataaatgactcaggttaaggctcctgccactatctgttgattaagtagtaga
 1621 tagttcctcagtagtaaatctaattgcagtaaatgaacttagtattctcattgctggtat
 1681 ttctggctatgtaatgttgacagaatgcattcaggagtgatcagatgcctccatgatgatg
 1741 ttgctttaagaagataggaatccaaacattgaaagtgcctaaaacctttgcacagtaggc
 1801 tactgtatatttgttactatctatgtgaaaaaa

图 1 银鲟 *dp1*、*cpa2l* 和 *sult2* 基因的核酸和氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *dp1*, *cpa2l* and *sult2* of *P. argenteus*

A: *dp1*; B: *cpa2l*; C: *sult2*

星号表示终止密码子, 虚线下划线表示信号肽的区域, 下划线表示激活肽区域。

The predicted stop codon of translation is marked with an asterisk, the signal peptide region is marked with dashed underlined, and the activating peptide is underlined.

长 948 bp, 包含 1 个 1 272 bp 的开放阅读框(ORF), 编码合成 1 个含有 423 氨基酸的蛋白。其 3'端发现了多聚腺苷酸加尾信号和 poly(A)尾巴, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAG。位于 3'-RACE PCR 产物上的终止密码子和 poly(A)尾巴表明了 Dp1 序列的完整性。银鲟 Dp1 的分子量为 47.2 kDa, 理论等电点为 5.18, 其氨基酸序列包含 1 个由 23 个氨基酸组成的信号肽(1~23 位)和 1 个典型的酰胺水解酶超家族的结构域(34~356 位)(图 2A)。使用 BLASTP 程序比对 Dp1 氨基酸序列(图 3A), 银鲟 Dp1 与蓝鳍金枪鱼(*Thunnus maccoyii*)的 Dp1 同源性最高为 88.5%, 与其他鱼类同源性也均高于 74.4%。通过 MEGA5.1 软件构建出多物种 Dp1 系统进化树(图 4A), 发现硬骨鱼类 Dp1 独立于

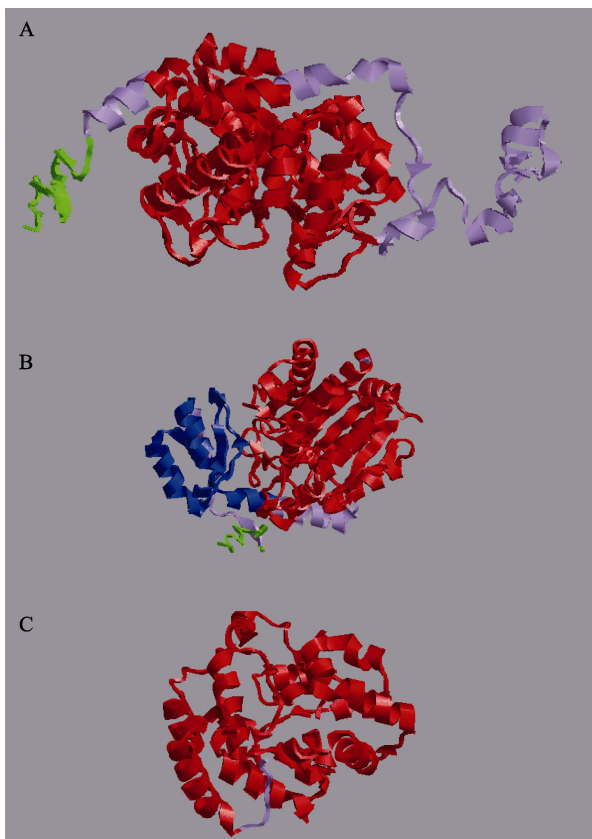


图 2 I-TASSER 分析 Dp1、Cpa21 和 Sult2 的 3D 结构
Fig.2 3D-structures of Dp1, Cpa21 and Sult2 predicted by I-TASSER

A: Dp1, 绿色表示信号肽区域, 红色表示 Peptidase_M19 家族结构域; B: Cpa21, 绿色表示信号肽区域, 蓝色表示激活肽区域, 红色表示 M14_CPA 结构域; C: Sult2, 红色表示磺基转移酶家族结构域。

A: Dp1, the green region is the signal peptide of Dp1, the red region is domain of Peptidase_M19; B: Cpa21, the green region is the signal peptide, the blue region is the activating peptide, the red region is the domain of M14_CPA; C: Sult2, the red region is the domain of sulfotransferase family.

高等脊椎动物和其他无脊椎动物单独聚为一枝, 银鲟 Dp1 与同为鲈形目(Perciformes)的蓝鳍金枪鱼和白梭吻鲈(*Sander lucioperca*)聚在一个分支上, 亲缘关系最近。

通过 RACE 方法成功获得了银鲟 *cpa21* (GenBank 登录号 OL471351)基因全长序列(图 1B)。*cpa21* 基因全长 1 421 bp (5'-UTR 长 67 bp, 3'-UTR 长 94 bp, ORF 长 1 260 bp), 编码合成 1 个含有 419 个氨基酸的蛋白。其 3'端发现了多聚腺苷酸加尾信号和 poly(A)尾巴, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA。位于 3'-RACE PCR 产物上的终止密码子和 poly(A)尾巴表明了 *cpa21* 基因的序列的完整性。银鲟 Cpa21 的分子量为 47.6 kDa, 理论等电点为 6.07, 其氨基酸序列包含 1 个由 16 个氨基酸组成的信号肽(1~16 位氨基酸)、1 个羧肽酶激活肽(31~100 位氨基酸)、1 个典型的 M14 金属羧肽酶家族的结构域(117~417 位氨基酸)(图 2B)。使用 BlastP 程序比对银鲟 Cpa21 氨基酸序列(图 3B、C), 银鲟 Cpa21 与蓝鳍金枪鱼 Cpa4 同源性最高(88.8%), 与其他鱼类同源性也均高于 73.0%。通过 MEGA5.1 软件构建出多物种 Cpa2、Cpa21 和 Cpa4 的进化树(图 4B), 发现硬骨鱼类 Cpa21 独立于高等脊椎动物和其他无脊椎动物单独聚为一枝, 银鲟 Cpa21 与同为鲈形目的蓝鳍金枪鱼的 Cpa4、大西洋鲷(*Sparus aurata*)的 Cpa21 和黄鳍棘鲷的 Cpa4 基因聚在一个分支上, 亲缘关系最近。经过进化树和氨基酸序列比对分析发现, Cpa21 和 Cpa4 相似度极高。

通过 RACE 方法在银鲟中成功获得了 *sult2* (GenBank 登录号 OL471352)基因全长序列(图 1C)。*sult2* 基因全长 1 834 bp, 5'-UTR 长 321 bp, 3'-UTR 长 799 bp, 包含 1 个 714 bp 的 ORF, 编码合成 1 个含有 237 氨基酸的蛋白。其 3'端发现 poly(A)尾巴, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA。位于 3'-RACE PCR 产物上的终止密码子和 poly(A)尾巴表明了 *Sult2* 基因序列的完整性。*Sult2* 的分子量为 27.9 kDa, 理论等电点为 6.61, 其氨基酸序列包含 1 个典型的磺基转移酶家族的结构域(1~229 位氨基酸)(图 2C)。使用 BlastP 程序比对 *Sult2* 氨基酸序列(图 3D), 银鲟 *Sult2* 与蓝鳍金枪鱼 *Sult2* 同源性最高(86.5%), 与其他鱼类同源性也均高于 75.1%。通过 MEGA5.1 构建出多物种 *Sult2* 系统进化树(图 4C), 发现硬骨鱼类 *Sult2* 独立于高等脊椎动物和其他无脊椎动物单独聚为一枝, 银鲟 *Sult2* 与剑鱼(*Xiphias gladius*)和蓝鳍金枪鱼聚在一个分支上, 亲缘关系最近。

2.2 银鲟 3 个营养代谢相关基因的组织表达模式及摄食水母对其表达规律的影响

使用 RT-qPCR 的方法检测 *dp1*、*cpa21* 和 *sult2*

A

Table with 2 columns: Accession numbers and gene names (e.g., dipeptidase_1 [Pampus argenteus], dipeptidase_1 [Thunnus maccoyii]).

Table with 2 columns: Accession numbers and gene names (e.g., dipeptidase_1 [Pampus argenteus], dipeptidase_1 [Thunnus maccoyii]).

Table with 2 columns: Accession numbers and gene names (e.g., dipeptidase_1 [Pampus argenteus], dipeptidase_1 [Thunnus maccoyii]).

Peptidase M19

Table with 2 columns: Accession numbers and gene names (e.g., CARBOXYPEPTIDASE A2-LIKE [PAMPUS ARGENTUS], CARBOXYPEPTIDASE A4 [THUNNUS MACCOYII]).

Table with 2 columns: Accession numbers and gene names (e.g., CARBOXYPEPTIDASE A2-LIKE [PAMPUS ARGENTUS], CARBOXYPEPTIDASE A4 [THUNNUS MACCOYII]).

Accession	Gene Name	Species	Length
XP_042268149.1	carboxypeptidase A2-like [Pampus argenteus]	<i>Pampus argenteus</i>	418
XP_05520189.1	carboxypeptidase A4 [Thunnus maccoyii]	<i>Thunnus maccoyii</i>	418
XP_010736447.1	carboxypeptidase A4 [Mora moro]	<i>Mora moro</i>	418
XP_037623423.1	carboxypeptidase A4 [Sebastes ubrosus]	<i>Sebastes ubrosus</i>	418
XP_042352170.1	carboxypeptidase A4 [Plectropomus leopardus]	<i>Plectropomus leopardus</i>	418
XP_029495442.1	carboxypeptidase A2-like [Seriola lalandi]	<i>Seriola lalandi</i>	418
XP_036962613.1	carboxypeptidase A2-like [Acanthopagrus latus]	<i>Acanthopagrus latus</i>	451
XP_030280556.1	carboxypeptidase A2-like [Sparus aurata]	<i>Sparus aurata</i>	451
XP_03490419.1	carboxypeptidase A4 [Epinelus lanceolatus]	<i>Epinelus lanceolatus</i>	419
XP_022612034.1	carboxypeptidase A2-like [Isoform X1]	<i>Isoform X1</i>	451
XP_035498920.1	carboxypeptidase A1-like [Scophthalmus aquosus]	<i>Scophthalmus aquosus</i>	418
XP_029478884.1	carboxypeptidase A2-like [Micropterus salmoides]	<i>Micropterus salmoides</i>	418
XP_040894316.1	carboxypeptidase A4 [Tokotes jaculatrix]	<i>Tokotes jaculatrix</i>	451
XP_039982929.1	carboxypeptidase A4 [Cheilinus undulatus]	<i>Cheilinus undulatus</i>	454
XP_03851426.1	carboxypeptidase A2-like [Micropterus salmoides]	<i>Micropterus salmoides</i>	418
XP_041853931.1	carboxypeptidase A2-like [Melanotaenia bimaculata]	<i>Melanotaenia bimaculata</i>	418
XP_023130020.1	carboxypeptidase A1-like [Amphiprion ocellatus]	<i>Amphiprion ocellatus</i>	418
XP_02949771.1	carboxypeptidase A2-like [Myripristis muriei]	<i>Myripristis muriei</i>	418
XP_020449170.1	carboxypeptidase A2-like [Monopterus albus]	<i>Monopterus albus</i>	418
XP_026167028.1	carboxypeptidase A2-like [Mastacembelus armatus]	<i>Mastacembelus armatus</i>	429
XP_024443119.1	carboxypeptidase A4 [Hippoglossus hippoglossus]	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	418
XP_01185704.2	carboxypeptidase A2-like [Cyprinodon tulum]	<i>Cyprinodon tulum</i>	418
XP_038163236.1	carboxypeptidase A2-like [Cyprinodon tulum]	<i>Cyprinodon tulum</i>	444
XP_04049431.1	carboxypeptidase A2 [Orzias latipes]	<i>Orzias latipes</i>	418
XP_02961101.1	carboxypeptidase A2-like [Salmo trutta]	<i>Salmo trutta</i>	417
XP_029523257.1	carboxypeptidase A2-like [Conorhynchus nasutus]	<i>Conorhynchus nasutus</i>	417
XP_011089619.1	carboxypeptidase A2 [Isox lucius]	<i>Isox lucius</i>	417
XP_04196358.1	carboxypeptidase A2-like [Epiplatys spilargenteus]	<i>Epiplatys spilargenteus</i>	418
XP_036373903.1	carboxypeptidase A2-like [Megalops cyprinoides]	<i>Megalops cyprinoides</i>	418
XP_028814192.1	carboxypeptidase A2-like [Denticeps cluodensis]	<i>Denticeps cluodensis</i>	418
XP_02947463.1	carboxypeptidase A2-like [Cyprinus carpio]	<i>Cyprinus carpio</i>	418
XP_031963475.1	carboxypeptidase A2-like [Corvus monedula]	<i>Corvus monedula</i>	416
XP_042672264.1	carboxypeptidase A2-like [Isoform X1]	<i>Isoform X1</i>	432
XP_040192970.1	carboxypeptidase A2-like [Isoform X1]	<i>Isoform X1</i>	417

M14_CPA

Accession	Gene Name	Species	Length
XP_04048349.1	carboxypeptidase A2-like [Seriola chuatsi]	<i>Seriola chuatsi</i>	122
XP_037623423.1	carboxypeptidase A4 [Sebastes ubrosus]	<i>Sebastes ubrosus</i>	122
XP_042352170.1	carboxypeptidase A4 [Plectropomus leopardus]	<i>Plectropomus leopardus</i>	122
XP_03187711.1	carboxypeptidase A4 [Thunnus maccoyii]	<i>Thunnus maccoyii</i>	122
XP_042268149.1	carboxypeptidase A4 [Thunnus maccoyii]	<i>Thunnus maccoyii</i>	122
XP_040019207.1	carboxypeptidase A4 [Gasterosteus aculeatus]	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	122
XP_04194519.1	carboxypeptidase A4 [Cheilinus undulatus]	<i>Cheilinus undulatus</i>	122
XP_043892385.1	carboxypeptidase A4 [Solea senegalensis]	<i>Solea senegalensis</i>	123
XP_034390229.1	carboxypeptidase A4 [Cyclopterus lumpus]	<i>Cyclopterus lumpus</i>	123
XP_040894316.1	carboxypeptidase A4 [Epinelus lanceolatus]	<i>Epinelus lanceolatus</i>	123
XP_036962613.1	carboxypeptidase A4 [Acanthopagrus latus]	<i>Acanthopagrus latus</i>	155
XP_03115156.1	carboxypeptidase A4 [Sander lucioperca]	<i>Sander lucioperca</i>	123
XP_041651761.1	carboxypeptidase A4 [Cheilinus undulatus]	<i>Cheilinus undulatus</i>	123
XP_030280556.1	carboxypeptidase A2-like [Sparus aurata]	<i>Sparus aurata</i>	155
XP_033490419.1	carboxypeptidase A4 [Epinelus lanceolatus]	<i>Epinelus lanceolatus</i>	123
XP_034542477.1	carboxypeptidase A4 [Nocobranchius celidopterus]	<i>Nocobranchius celidopterus</i>	123
XP_03443415.1	carboxypeptidase A4 [Hippoglossus hippoglossus]	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	122
XP_026220447.1	carboxypeptidase A4 [Anabas testudineus]	<i>Anabas testudineus</i>	122
XP_039663498.1	carboxypeptidase A4 [Perca fluviatilis]	<i>Perca fluviatilis</i>	122
XP_034735711.1	carboxypeptidase A4 [Etheostoma cragini]	<i>Etheostoma cragini</i>	158
XP_039982929.1	carboxypeptidase A4 [Cheilinus undulatus]	<i>Cheilinus undulatus</i>	158
XP_026167028.1	carboxypeptidase A2-like [Mastacembelus armatus]	<i>Mastacembelus armatus</i>	133
XP_02612034.1	carboxypeptidase A2-like [Echeinis naucraus]	<i>Echeinis naucraus</i>	122
XP_029378884.1	carboxypeptidase A2-like [Echeinis naucraus]	<i>Echeinis naucraus</i>	122
XP_029289542.1	carboxypeptidase A2-like [Cotopercera gobio]	<i>Cotopercera gobio</i>	122
XP_02049170.1	carboxypeptidase A2-like [Seriola lalandi]	<i>Seriola lalandi</i>	155
XP_023253170.1	carboxypeptidase A2-like [Seriola lalandi]	<i>Seriola lalandi</i>	122
XP_032378609.1	carboxypeptidase A2-like [Etheostoma spectabile]	<i>Etheostoma spectabile</i>	151
XP_041853931.1	carboxypeptidase A2-like [Micropterus salmoides]	<i>Micropterus salmoides</i>	122
XP_02841587.1	carboxypeptidase A2-like [Perca fluviatilis]	<i>Perca fluviatilis</i>	122
XP_03851426.1	carboxypeptidase A2-like [Micropterus salmoides]	<i>Micropterus salmoides</i>	122
XP_02949771.1	carboxypeptidase A2-like [Myripristis muriei]	<i>Myripristis muriei</i>	122
XP_017285704.2	carboxypeptidase A2-like [Kryptolebias marmoratus]	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	122
XP_030587258.1	carboxypeptidase A2-like [Archoctenopus centronchus]	<i>Archoctenopus centronchus</i>	122
XP_007628413.1	carboxypeptidase A2-like [Melanoprolagus beudanticus]	<i>Melanoprolagus beudanticus</i>	148
XP_038163236.1	carboxypeptidase A2-like [Cyprinodon tulum]	<i>Cyprinodon tulum</i>	148
XP_031720057.1	carboxypeptidase A2-like [Anarrhichthys ocellatus]	<i>Anarrhichthys ocellatus</i>	122
XP_026032829.1	carboxypeptidase A2-like [Astactolipia calliptera]	<i>Astactolipia calliptera</i>	122

Accession	Gene Name	Species	Length
XP_04048349.1	carboxypeptidase A2-like [Seriola chuatsi]	<i>Seriola chuatsi</i>	282
XP_037623423.1	carboxypeptidase A4 [Sebastes ubrosus]	<i>Sebastes ubrosus</i>	282
XP_042352170.1	carboxypeptidase A4 [Plectropomus leopardus]	<i>Plectropomus leopardus</i>	282
XP_03187711.1	carboxypeptidase A4 [Thunnus maccoyii]	<i>Thunnus maccoyii</i>	282
XP_042268149.1	carboxypeptidase A4 [Thunnus maccoyii]	<i>Thunnus maccoyii</i>	282
XP_040019207.1	carboxypeptidase A4 [Gasterosteus aculeatus]	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	282
XP_04194519.1	carboxypeptidase A4 [Cheilinus undulatus]	<i>Cheilinus undulatus</i>	282
XP_043892385.1	carboxypeptidase A4 [Solea senegalensis]	<i>Solea senegalensis</i>	283
XP_034390229.1	carboxypeptidase A4 [Cyclopterus lumpus]	<i>Cyclopterus lumpus</i>	283
XP_040894316.1	carboxypeptidase A4 [Epinelus lanceolatus]	<i>Epinelus lanceolatus</i>	282
XP_036962613.1	carboxypeptidase A4 [Acanthopagrus latus]	<i>Acanthopagrus latus</i>	315
XP_03115156.1	carboxypeptidase A4 [Sander lucioperca]	<i>Sander lucioperca</i>	282
XP_041651761.1	carboxypeptidase A4 [Cheilinus undulatus]	<i>Cheilinus undulatus</i>	282
XP_030280556.1	carboxypeptidase A2-like [Sparus aurata]	<i>Sparus aurata</i>	315
XP_033490419.1	carboxypeptidase A4 [Epinelus lanceolatus]	<i>Epinelus lanceolatus</i>	283
XP_034542477.1	carboxypeptidase A4 [Nocobranchius celidopterus]	<i>Nocobranchius celidopterus</i>	282
XP_03443415.1	carboxypeptidase A4 [Hippoglossus hippoglossus]	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	282
XP_026220447.1	carboxypeptidase A4 [Anabas testudineus]	<i>Anabas testudineus</i>	282
XP_039663498.1	carboxypeptidase A4 [Perca fluviatilis]	<i>Perca fluviatilis</i>	282
XP_034735711.1	carboxypeptidase A4 [Etheostoma cragini]	<i>Etheostoma cragini</i>	318
XP_039982929.1	carboxypeptidase A4 [Cheilinus undulatus]	<i>Cheilinus undulatus</i>	318
XP_026167028.1	carboxypeptidase A2-like [Mastacembelus armatus]	<i>Mastacembelus armatus</i>	293
XP_02612034.1	carboxypeptidase A2-like [Echeinis naucraus]	<i>Echeinis naucraus</i>	282
XP_029378884.1	carboxypeptidase A2-like [Echeinis naucraus]	<i>Echeinis naucraus</i>	282
XP_029289542.1	carboxypeptidase A2-like [Cotopercera gobio]	<i>Cotopercera gobio</i>	282
XP_02049170.1	carboxypeptidase A2-like [Seriola lalandi]	<i>Seriola lalandi</i>	315
XP_023253170.1	carboxypeptidase A2-like [Seriola lalandi]	<i>Seriola lalandi</i>	311
XP_032378609.1	carboxypeptidase A2-like [Etheostoma spectabile]	<i>Etheostoma spectabile</i>	311
XP_041853931.1	carboxypeptidase A2-like [Micropterus salmoides]	<i>Micropterus salmoides</i>	282
XP_02841587.1	carboxypeptidase A2-like [Perca fluviatilis]	<i>Perca fluviatilis</i>	282
XP_03851426.1	carboxypeptidase A2-like [Micropterus salmoides]	<i>Micropterus salmoides</i>	282
XP_02949771.1	carboxypeptidase A2-like [Myripristis muriei]	<i>Myripristis muriei</i>	282
XP_017285704.2	carboxypeptidase A2-like [Kryptolebias marmoratus]	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	282
XP_030587258.1	carboxypeptidase A2-like [Archoctenopus centronchus]	<i>Archoctenopus centronchus</i>	282
XP_007628413.1	carboxypeptidase A2-like [Melanoprolagus beudanticus]	<i>Melanoprolagus beudanticus</i>	308
XP_038163236.1	carboxypeptidase A2-like [Cyprinodon tulum]	<i>Cyprinodon tulum</i>	282
XP_031720057.1	carboxypeptidase A2-like [Anarrhichthys ocellatus]	<i>Anarrhichthys ocellatus</i>	282
XP_026032829.1	carboxypeptidase A2-like [Astactolipia calliptera]	<i>Astactolipia calliptera</i>	282

Accession	Gene Name	Species	Length
XP_04048349.1	carboxypeptidase A2-like [Seriola chuatsi]	<i>Seriola chuatsi</i>	418
XP_037623423.1	carboxypeptidase A4 [Sebastes ubrosus]	<i>Sebastes ubrosus</i>	418
XP_042352170.1	carboxypeptidase A4 [Plectropomus leopardus]	<i>Plectropomus leopardus</i>	418
XP_03187711.1	carboxypeptidase A4 [Thunnus maccoyii]	<i>Thunnus maccoyii</i>	418
XP_042268149.1	carboxypeptidase A4 [Thunnus maccoyii]	<i>Thunnus maccoyii</i>	418
XP_040019207.1	carboxypeptidase A4 [Gasterosteus aculeatus]	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	418
XP_04194519.1	carboxypeptidase A4 [Cheilinus undulatus]	<i>Cheilinus undulatus</i>	418
XP_043892385.1	carboxypeptidase A4 [Solea senegalensis]	<i>Solea senegalensis</i>	419
XP_034390229.1	carboxypeptidase A4 [Cyclopterus lumpus]	<i>Cyclopterus lumpus</i>	419
XP_040894316.1	carboxypeptidase A4 [Epinelus lanceolatus]	<i>Epinelus lanceolatus</i>	451
XP_036962613.1	carboxypeptidase A4 [Acanthopagrus latus]	<i>Acanthopagrus latus</i>	418
XP_03115156.1	carboxypeptidase A4 [Sander lucioperca]	<i>Sander lucioperca</i>	418
XP_041651761.1	carboxypeptidase A4 [Cheilinus undulatus]	<i>Cheilinus undulatus</i>	419
XP_030280556.1	carboxypeptidase A2-like [Sparus aurata]	<i>Sparus aurata</i>	451
XP_033490419.1	carboxypeptidase A4 [Epinelus lanceolatus]	<i>Epinelus lanceolatus</i>	419
XP_034542477.1	carboxypeptidase A4 [Nocobranchius celidopterus]	<i>Nocobranchius celidopterus</i>	418
XP_03443415.1	carboxypeptidase A4 [Hippoglossus hippoglossus]	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	418
XP_026220447.1	carboxypeptidase A4 [Anabas testudineus]	<i>Anabas testudineus</i>	418
XP_039663498.1	carboxypeptidase A4 [Perca fluviatilis]	<i>Perca fluviatilis</i>	418
XP_034735711.1	carboxypeptidase A4 [Etheostoma cragini]	<i>Etheostoma cragini</i>	418
XP_039982929.1	carboxypeptidase A4 [Cheilinus undulatus]	<i>Cheilinus undulatus</i>	454
XP_026167028.1	carboxypeptidase A2-like [Mastacembelus armatus]	<i>Mastacembelus armatus</i>	418
XP_02612034.1	carboxypeptidase A2-like [Isoform X1]	<i>Isoform X1</i>	451
XP_029378884.1	carboxypeptidase A2-like [Echeinis naucraus]	<i>Echeinis naucraus</i>	418
XP_029289542.1	carboxypeptidase A2-like [Cotopercera gobio]	<i>Cotopercera gobio</i>	418
XP_02049170.1	carboxypeptidase A2-like [Seriola lalandi]	<i>Seriola lalandi</i>	451
XP_023253170.1	carboxypeptidase A2-like [Seriola lalandi]	<i>Seriola lalandi</i>	447
XP_032378609.1	carboxypeptidase A2-like [Etheostoma spectabile]	<i>Etheostoma spectabile</i>	418
XP_041853931.1	carboxypeptidase A2-like [Micropterus salmoides]	<i>Micropterus salmoides</i>	418
XP_02841587.1	carboxypeptidase A2-like [Perca fluviatilis]	<i>Perca fluviatilis</i>	418
XP_03851426.1	carboxypeptidase A2-like [Micropterus salmoides]	<i>Micropterus salmoides</i>	418
XP_02949771.1	carboxypeptidase A2-like [Myripristis muriei]	<i>Myripristis muriei</i>	418
XP_017285704.2	carboxypeptidase A2-like [Kryptolebias marmoratus]	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	418
XP_030587258.1	carboxypeptidase A2-like [Archoctenopus centronchus]	<i>Archoctenopus centronchus</i>	418
XP_007628413.1	carboxypeptidase A2-like [Melanoprolagus beudanticus]	<i>Melanoprolagus beudanticus</i>	444
XP_038163236.1	carboxypeptidase A2-like [Cyprinodon tulum]	<i>Cyprinodon tulum</i>	444
XP_031720057.1	carboxypeptidase A2-like [Anarrhichthys ocellatus]	<i>Anarrhichthys ocellatus</i>	418
XP_026032829.1	carboxypeptidase A2-like [Astactolipia calliptera]	<i>Astactolipia calliptera</i>	418

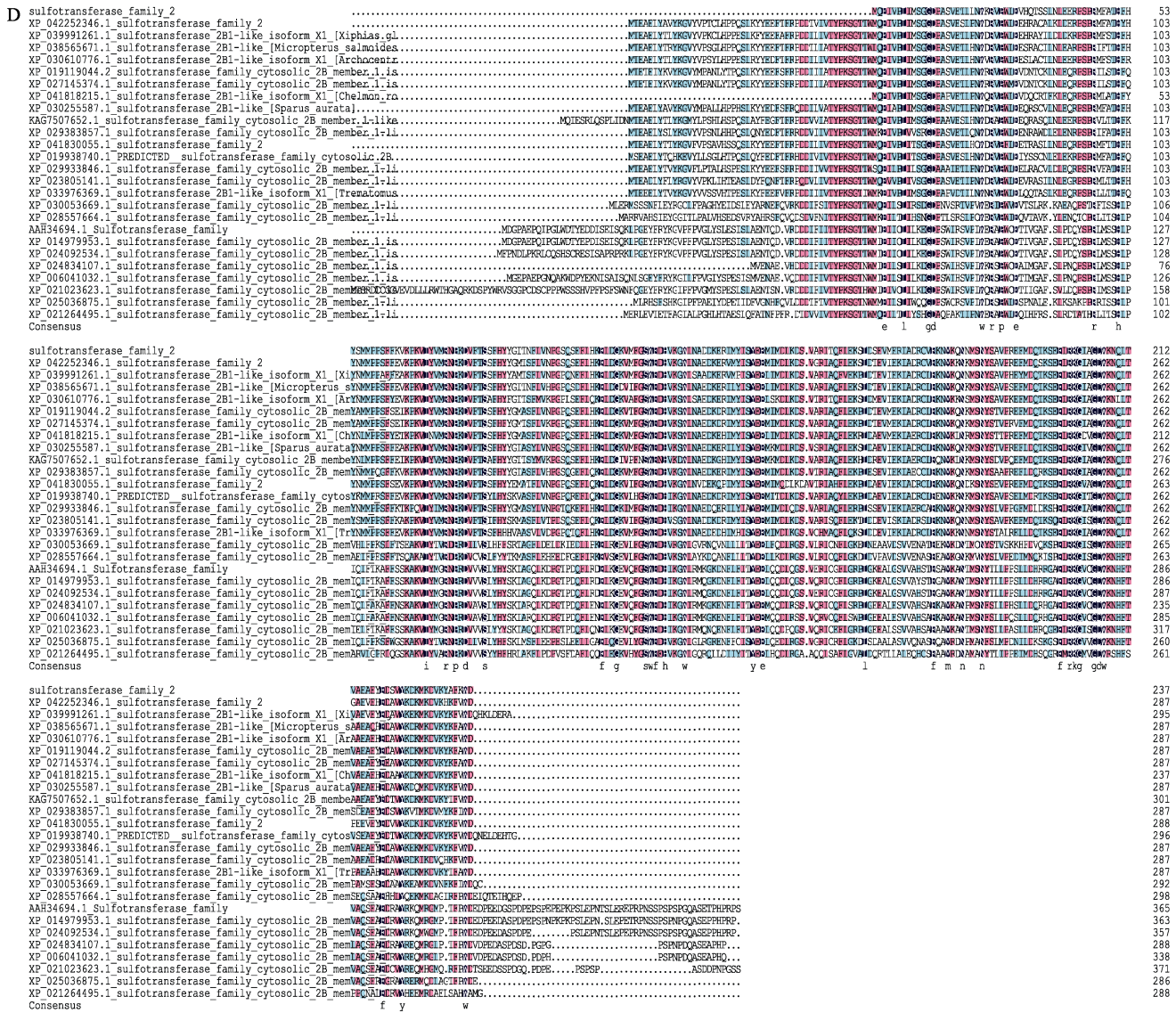


图 3 基于银鲳和其他物种的 Dp1、Cpa2l、Cpa4 和 Sult2 氨基酸序列的序列比对

Fig.3 Alignment of deduced amino acid sequences of Dp1, Cpa2l, Cpa4 and Sult2 of *P. argenteus* and other species

A: Dp1; B: Cpa2l; C: Cpa4; D: Sult2.

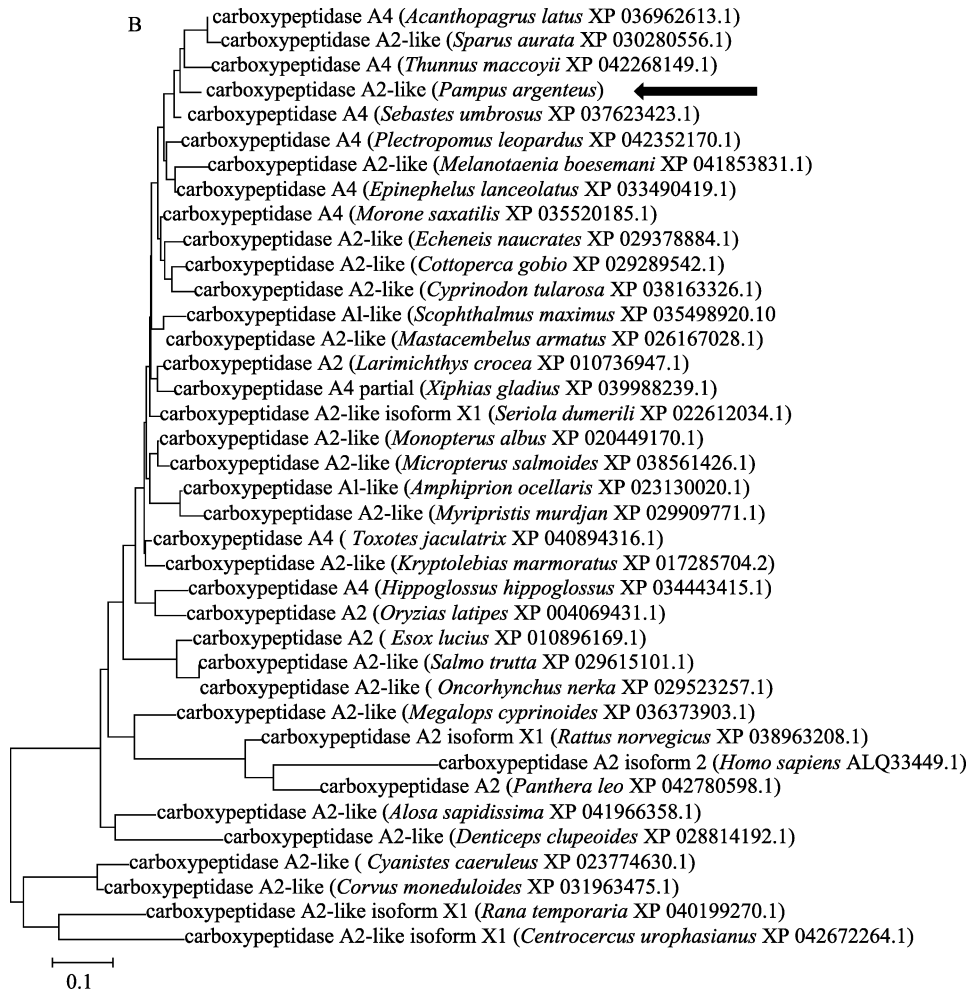
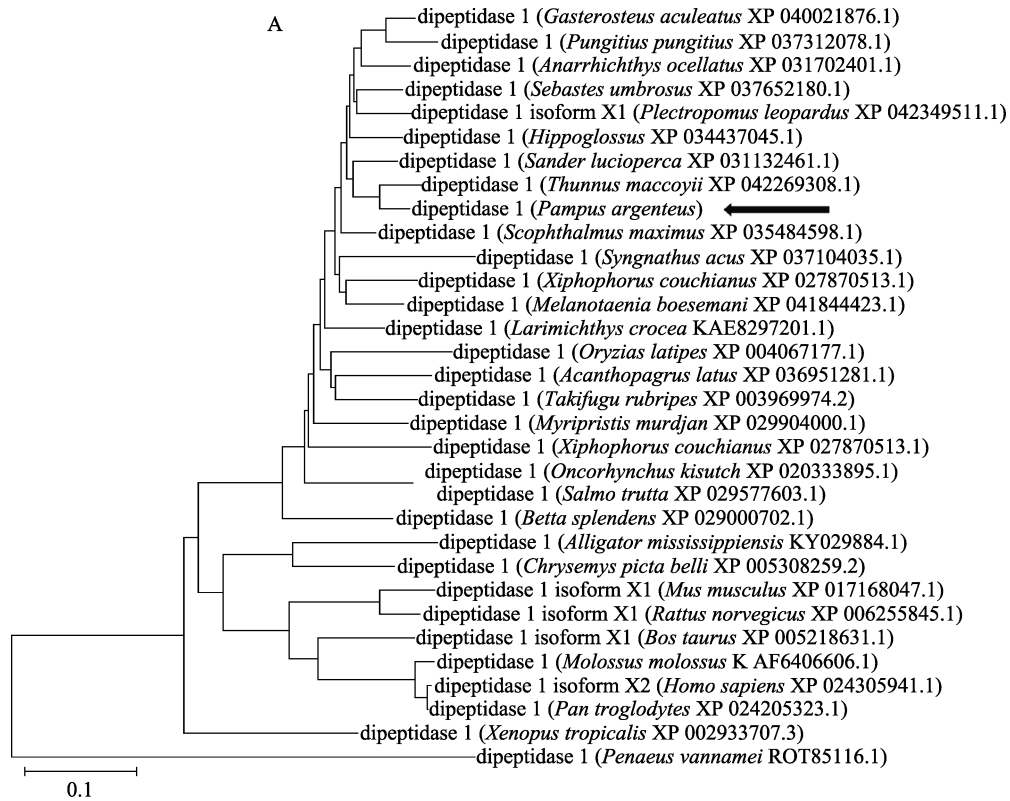
下划线为结构域。The domain is boxed.

基因在不同组织的表达模式及摄食水母对其表达规律的影响(图 5)。其中, *dpl* 在各个组织中均有表达, 且无论是否摄食水母, *dpl* 均在肝脏中表达量最高。与未摄食水母组相比, 摄食水母组 *dpl* 基因在脑和鳃中的表达量极显著增加($P < 0.01$), 在中肠和肾脏中显著增加($P < 0.05$), 而在肌肉中显著下降($P < 0.05$)(图 5A)。
cpa2l 基因在中肠、脑、鳃、肝脏、肾脏和肌肉中均有表达, 在未摄食水母组的肾脏中表达量最低, 在中肠表达量最高, 其次为肌肉; 而在摄食水母组中, *cpa2l* 在肾脏中的表达量最高($P < 0.05$)。与未摄食水母组相比, 摄食水母组 *cpa2l* 在肝脏中的表达量极显著增加($P < 0.01$), 而在鳃中显著下降($P < 0.05$), 在中

肠和肌肉中极显著下降($P < 0.01$)(图 5B)。
sult2 基因在中肠、脑、鳃、肝脏、肾脏和肌肉中均有表达, 且无论是否摄食水母, *sult2* 在肝脏中的表达量最高, 在鳃中表达量最低($P < 0.05$)。与未摄食水母组相比, 摄食水母组肌肉中 *sult2* 基因的表达量极显著降低($P < 0.01$), 在中肠、脑、鳃、肝脏和肾脏中显著增加($P < 0.05$)(图 5C)。

3 讨论

3.1 银鲳 3 个营养代谢相关基因的生物信息学分析
 本研究结果显示, 银鲳 *dpl* 基因编码的氨基酸序



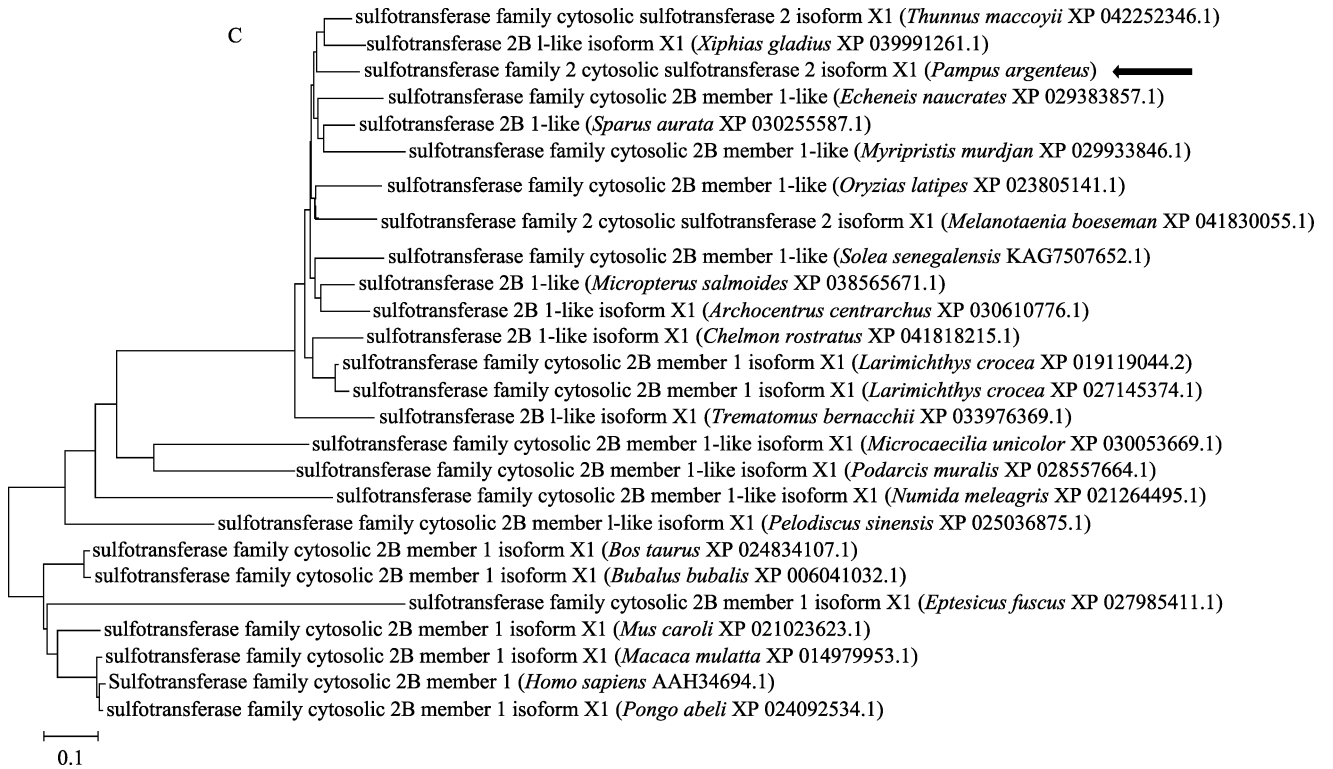


图 4 银鲳和其他动物 Dp1、Cpa2l 和 Sult2 氨基酸序列的系统进化树

Fig.4 Neighbor-Joining phylogenetic tree of Dp1, Cpa2l and Sult2 from *P. argenteus* and other animals

A: Dp1; B: Cpa2l; C: Sult2.

系统进化树使用 MEGA 5.0 软件提供的 NJ 法生成, 进行了 1 000 次重复引导测试。

The phylogenetic tree was generated using the neighbor-joining method provided by the software MEGA 5.0, and bootstrapping test was performed with 1 000 replicates.

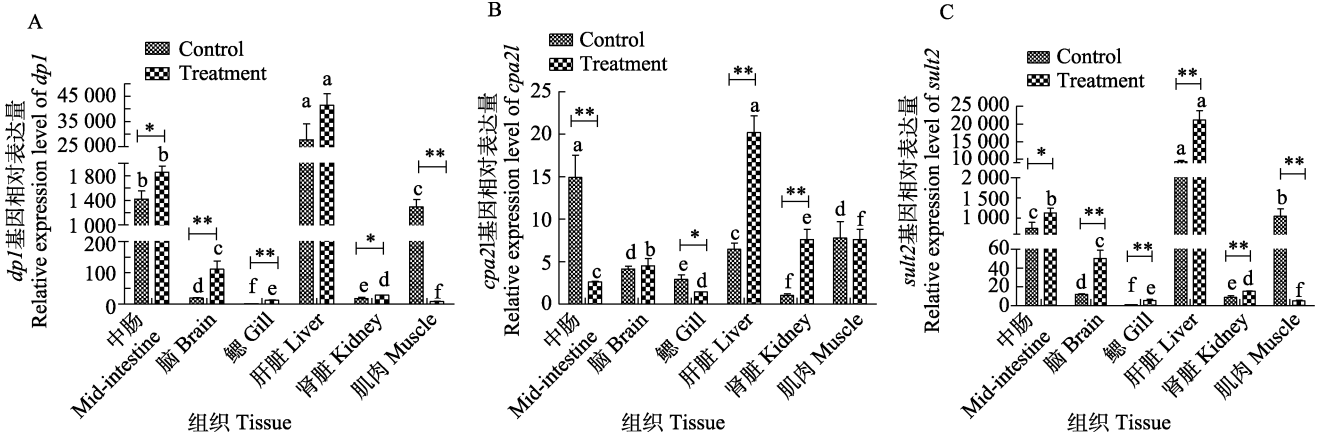


图 5 摄食水母对银鲳 *dp1*、*cpa2l* 和 *sult2* 基因不同组织中相对表达量的影响(平均值±标准差, $n=6$)

Fig.5 Effects of jellyfish intake on the expressions of *dp1*, *cpa2l* and *sult2* in different tissues of *P. argenteus* (Mean±SD, $n=6$)

不同字母表示同一处理组中不同组织间的差异显著($P<0.05$),

*表示同一组织不同处理组间差异显著($P<0.05$), **表示同一组织不同处理组间差异极显著($P<0.01$)。

Column with different letters were considered significant different between different tissues in the same group.

* mean that the difference was significant ($P<0.05$) between different groups in the same tissue, ** mean that the difference was highly significant ($P<0.01$) between different groups in the same tissue.

列包含 1 个信号蛋白肽和 1 个典型的酰胺水解酶超家族的

白, 能够水解糖蛋白。Cai 等(2021)针对大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)的研究结果同样表明, *dp1* 基因

编码的氨基酸序列是一种水解短肽的糖蛋白。通过将银鲳 Dp1 与其他物种 Dp1 氨基酸进行同源比较,发现银鲳 Dp1 与蓝鳍金枪鱼的 Dp1 同源性最高(88.5%),与其他鱼类同源性也均高于 74.4%,不同物种 Dp1 存在一定程度的差异化,但其 N 端和 C 端差异较小,结构域也相对保守,表明 *dp1* 基因在整个鱼类进化过程中较为保守。

银鲳 *cpa2l* 基因编码的氨基酸序列包含 1 个信号蛋白肽、1 个羧肽酶激活肽和 1 个典型的 M14 金属羧肽酶家族的结构域, M14 金属羧肽酶家族是锌结合蛋白,可水解多肽链中的单 C 端氨基酸。与 Srivastava 等(2003)在对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的研究结果相一致。将银鲳 *Cpa2l* 与其他物种 *Cpa2*、*Cpa2l* 和 *Cpa4* 进行同源对比发现,仅 N 端有较小差异,结构域也较为保守,这表明 *cpa2l* 基因在鱼类中均较为保守。从银鲳 *Cpa2l* 和其他物种 *Cpa2*、*Cpa2l* 和 *Cpa4* 的进化树以及近缘物种氨基酸序列的比较分析发现, *Cpa2l* 和 *Cpa4* 氨基酸序列相似度较高,均高于 80%,且无明显氨基酸位点差异,推测 *Cpa2l* 和 *Cpa4* 可能为同一个基因。

银鲳 *Sult2* 氨基酸序列包含 1 个典型的磺基转移酶家族的结构域,这在斑马鱼(*Danio rerio*) *Sult2* 的研究报道中也得到了印证(Sugahara *et al*, 2003),与马氏珠母贝(*Pinctada martensii*) *Sult2* 的研究报道也有一定的相似性(王庆恒等, 2017),二者均表明其参与催化芳胺化合物、类固醇、激素和生物胺等多种内源和外源分子的磺酸化反应。同源比对结果显示,银鲳 *Sult2* 与其他物种 *Sult2* 氨基酸存在不同程度的差异,其中, N 端和 C 端差异较大。系统进化树分析的结果也发现,银鲳与金枪鱼等硬骨鱼聚在一个大的分支上,亲缘关系较近,但结构域也存在一定差异,与哺乳类、两栖类和脊索动物亲缘关系较远。上述研究均表明, *Sult2* 基因的大多数残基在鱼类中相对保守,但其结构域以及 N、C 端存在一定的差异。

3.2 银鲳 3 个基因的组织表达模式及摄食水母对其表达规律的影响

二肽酶是一种水解二肽的膜结合糖蛋白,参与青霉素类和碳青霉烯类 β -内酰胺类抗生素的水解代谢(Habib *et al*, 1996)。本研究结果发现,摄食水母组银鲳 *dp1* 基因在肠道中的表达量显著高于未摄食水母组。Gelman 等(2003)在河鲈(*Pera fluviatilis*)的研究中同样发现,肠道中 *dp1* 基因编码的酶活性随着消化过程呈升高趋势。多数研究认为,二肽酶是一种自我调节酶,其活性变化能响应食物成分的变化(彭志兰等,

2021; Ugolev *et al*, 1975; Gruzdkov *et al*, 1981)。Stevens 等(1984)研究发现,二肽酶在大黄鱼的鳃、头肾和肝脏等多种免疫相关组织中均有中等水平的表达,推测其可能在大黄鱼的渗透压调节和免疫应答中发挥重要作用。在本研究中,摄食水母组和未摄食水母组的肝脏中均具有最高的表达量,且与未摄食水母组相比,摄食水母组除肌肉组织外,其他组织中的表达量均有不同程度的增加,由此可推测, *dp1* 基因在机体内可能参与水母营养物质的消化吸收和营养素的组织沉积过程。

羧肽酶是由外分泌腺合成和分泌的蛋白水解酶,催化水解多肽链中含羧基的末端氨基酸,参与食物的降解(Srivastava *et al*, 2003),根据底物的偏好分为 2 个成员,羧肽酶 A (Cpa)和羧肽酶 B (Cpb)(曹婷婷等, 2012)。羧肽酶除了在消化食物以合成神经内分泌肽的过程中起作用以外, *cpa* 基因还调节先天免疫反应并降解有害物质,如血管收缩因子内皮素和蛇毒毒素(Pejler *et al*, 2009), *cpb* 基因参与调控多种人类疾病(Garand *et al*, 2003)。史宗畔等(2017)研究发现,在饲喂后中华按蚊(*Anopheles sinensis*)的 *cpa* 基因表达量上调,在 24 h 时 PMB 达到峰值,推测其可能参与血液蛋白质的消化。而本研究结果显示,摄食水母组银鲳 *cpa2l* 基因在中肠中的含量极显著低于未摄食水母组,推测 *cpa2l* 基因表达调控机制可能存在物种差异性,其具体的响应机制还需进一步研究。此外,本研究还发现,摄食水母组银鲳 *cpa2l* 基因在肝脏中的表达量极显著高于未摄食水母组,推测其可能主要参与调控肝脏中营养物质的合成与分解代谢过程。

磺基转移酶是一个催化底物磺化的酶家族。膜结合磺基转移酶介导脂质、蛋白质和肽的磺化,而胞质磺基转移酶主要催化各种外源性物质、药物、有毒化合物、化学致癌物、类固醇激素、脂质、胆汁酸和肽的磺化等重要生物过程(Gamage *et al*, 2006; Lind *et al*, 2008)。在大鼠(*Rattus norvegicus*)的研究中发现,禁食大鼠的下丘脑米诺地尔磺基转移酶(minoxidil sulfotransferase)基因表达量上调,且肥胖大鼠、小鼠(*Mus musculus*)的表达量比同种类的瘦鼠的表达量平均增加 80%,表明该基因参与了食欲调节(Li *et al*, 2002)。本研究发现,银鲳摄食水母组 *sult2* 基因在中肠和脑中的表达量显著高于未摄食水母组,推测喂食水母能影响银鲳对营养物质的消化吸收过程及食欲的调节。王庆恒等(2017)研究发现,马氏珠母贝 *sult* 基因在肝脏中表达量最高,与本研究银鲳 *sult2* 基因的表达规律一致,且摄食水母组肝脏 *sult2* 基因表

达量显著高于未摄食水母组, 推测其同样参与了肝脏中营养物质代谢的过程。

4 结论

本研究克隆获得银鲳 *dp1*、*cpa2l* 和 *sult2* 基因的全序列, 这 3 个基因分别与蓝鳍金枪鱼的 *dp1*、*cpa4* 和 *sult2* 基因高度同源。*dp1*、*cpa2l* 和 *sult2* 基因在银鲳中肠、脑、鳃、肝脏、肾脏和肌肉中均有表达, 通过分析摄食水母对 3 个基因组织表达模式的影响, 推测这 3 个基因在银鲳摄食水母后机体营养物质的消化吸收、代谢及组织沉积过程中起到重要的调控作用, *dp1* 主要参与调控消化吸收和组织中营养累积的过程, *cpa2l* 主要参与调控肝脏中营养代谢的过程, 而 *sult2* 可能在整个消化吸收和代谢过程中均起到重要的调控作用, 表明银鲳已经拥有应对水母这类高水分含量饵料的消化生理响应机制。

参 考 文 献

- SRIVASTAVA A S, KUROKAWA T, SUZUKI T. Molecular cloning and cDNA sequence analysis of carboxypeptidases A1, A2 and B from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 135(4): 593–599
- AROLAS J L, VENDRELL J, AVILES F X, *et al.* Metallocoarboxypeptidases: Emerging drug targets in biomedicine. *Current Pharmaceutical Design*, 2007, 13(4): 347–364
- CAI X H, HUANG Y Q, CHEN H L, *et al.* Identification and functional characterization of the transcription factor coding *Dp1* gene in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Heliyon*, 2021, 7(2): e06299
- CAO T T, BAI J J, YU L Y, *et al.* Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of carboxypeptidase A1 gene (*CPA1*) segments and their association with the growth traits of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20(3): 301–307 [曹婷婷, 白俊杰, 于凌云, 等. 草鱼羧肽酶 A1 基因(*CPA1*)部分片段的单核苷酸多态性(SNP)多态性及其与生长性状的关联分析. *农业生物技术学报*, 2012, 20(3): 301–307]
- CARDONA L, ÁLVAREZ DE QUEVEDO I, BORRELL A, *et al.* Massive consumption of gelatinous plankton by Mediterranean apex predators. *PLoS One*, 2012, 7: e31329
- DOYLE T K, HOUGHTON J D R, MCDEVITT R, *et al.* The energy density of jellyfish: estimates from bomb-calorimetry and proximate-composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 343: 239–252
- FU X Q, WANG N, WANG J L, *et al.* Characterization and expression analysis of *granzyme B like* gene in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(4): 136–146 [扶晓琴, 王娜, 王佳林, 等. 半滑舌鳎颗粒酶 B 基因的克隆和表达分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(4): 136–146]
- GAMAGE N, BARNET A, HEMPEL N, *et al.* Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicological Sciences*, 2006, 90(1): 5–22
- GARAND M, LIN J H H, ZAGORAC B, *et al.* Regulation of the gene encoding human thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor by estrogen and progesterone. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 2013, 24(4): 393–404
- GRUZDKOV A A, GUSEV V M, UGOLEV A M. The three-compartmental enzyme system of the enterocyte relating to its digestion and barrier functions. *Gastrointestinal Defence Mechanisms*, 1981, 29: 303–314
- HABIB G M, BARRIOS R, SHI Z Z, *et al.* Four distinct membrane-bound dipeptidase RNAs are differentially expressed and show discordant regulation with gamma-glutamyl transpeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(27): 16273–16280
- HITCHENS M R, ROBBINS P D. The role of the transcription factor DP in apoptosis. *Apoptosis*, 2003, 8: 461–468
- JEFFERY E H. *Human drug metabolism: From molecular biology to man*. CRC Press, 1993, 101–115
- JOSEP V, ENRIQUE Q, FRANCESC X A. Metallocoarboxypeptidases and their protein inhibitors: Structure, function and biomedical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2000, 1477(1/2): 284–298
- KAUFFMAN F C. *Conjugation-deconjugation reactions in drug metabolism and toxicity*. Springer, 1994, 45–78
- KIM W T, KIM H, KATANAIEV V L S, *et al.* Dual functions of *DP1* promote biphasic Wnt-on and Wnt-off states during anteroposterior neural patterning. *EMBO Journal*, 2012, 80730
- KOHN M J, BRONSON R T, HARLOW E, *et al.* *DP1* is required for extra-embryonic development. *Development*, 2003, 130(7): 1295–1305
- LI J Y, LESCURE P A, MISEK D E, *et al.* Food deprivation-induced expression of minoxidil sulfotransferase in the hypothalamus uncovered by microarray analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(11): 9069–9076
- LINDSAY J, WANG L L, LI Y, *et al.* Structure, function and polymorphism of human cytosolic sulfotransferases. *Current Drug Metabolism*, 2008, 9(2): 99–105
- LIU C S, ZHUANG Z M, CHEN S Q, *et al.* Medusa consumption and prey selection of silver pomfret *Pampus argenteus* juveniles. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2014, 32(1): 71–80
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the

- $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- MULDER G J, JAKOBY W B. Conjugation reactions in drug metabolism. London: Taylor and Francis, 1990, 107–161
- PEJLER G, KNIGHT S D, Henningsson F, *et al.* Novel insights into the biological function of mast cell carboxypeptidase A. *Trends in Immunology*, 2009, 30(8): 401–408
- PENG S M, SHI Z H, YIN F, *et al.* Feeding habits of silver pomfret (*Pampus argenteus*) in East China Sea based on stable isotope techniques. *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(7): 1565–1569 [彭士明, 施兆鸿, 尹飞, 等. 利用碳氮稳定同位素技术分析东海银鲷食性. *生态学杂志*, 2011, 30(7): 1565–1569]
- PENG Z L, LI L G, ZHENG Y Y, *et al.* On gastric evacuation characteristics and suitable feeding frequency of *Centropristis striata*. *Marine Fisheries*, 2021, 43(3): 318–326 [彭志兰, 李凌刚, 郑圆圆, 等. 条纹锯鲷胃排空特征和适宜投喂频率研究. *海洋渔业*, 2021, 43(3): 318–326]
- REZNIK S E, FRICKER L D. Carboxypeptidases from A to Z: Implications in embryonic development and Wnt binding. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, 58: 1790–1804
- SHI Z P, ZHI Z J, LUO S H, *et al.* Molecular characterization and blood feeding-related expression analysis of eight carboxypeptidase genes in *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60(6): 621–631 [史宗畔, 支中婧, 罗世惠, 等. 中华按蚊八个羧肽酶基因的鉴定及其与吸血餐相关的表达分析. *昆虫学报*, 2017, 60(6): 621–631]
- STEVENS D E, MCLEESE J M. Why bluefin tuna have warm tummies: Temperature effect on trypsin and chymotrypsin. *American Journal of Physiology*, 1984, 246(4): 487–494
- SUGAHARA T, LIU C C, PAI T G, *et al.* Molecular cloning, expression, and functional characterization of a novel zebrafish cytosolic sulfotransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 300(3): 725–730
- UGOLEV A M, GRUZDKOV A A, DE LAEY P, *et al.* Substrate interaction on the intestinal mucosa: A concept for the regulation of intestinal digestion. *British Journal of Nutrition*, 1975, 34(2): 205–220
- WANG D, RUSSELL J, XU H, *et al.* Deregulated expression of DPI1 induces epidermal proliferation and enhances skin carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis*, 2001, 31: 90–100
- WANG Q H, HAO R J, ZHENG Z, *et al.* Cloning and function of sulfotransferase gene PmCHST1a in *Pinctada martensii*. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(5): 669–677 [王庆恒, 郝瑞娟, 郑哲, 等. 马氏珠母贝磺基转移酶基因的克隆及功能. *水产学报*, 2017, 41(5): 669–677]
- WANG W L, SHI H N, ZENG B H, *et al.* Effects of dietary protein levels on growth performance of catfish-like loach *Triplophysa orientalis*. *Fisheries Science*, 2020, 39(4): 517–523 [王万良, 师海娜, 曾本和, 等. 饲料蛋白水平对东方高原鳅生长性能的影响. *水产科学*, 2020, 39(4): 517–523]
- WEI W, HE Y Y, LI Z X, *et al.* Cloning of *ATG5* gene of *Fenneropenaeus chinensis* and expression analysis under pH and carbonate alkalinity stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(3): 84–94 [魏威, 何玉英, 李朝霞, 等. 中国对虾 *ATG5* 基因的克隆及其在 pH、碳酸盐碱度胁迫下的表达分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(3): 84–94]
- ZHENG D, WANG Q, WANG L, *et al.* Effect of intestinal bubble accumulation on antioxidant enzyme and lysozyme activities in the tissues of *Pampus argenteus*. *Marine Fisheries*, 2021, 43(2): 201–208 [郑迪, 王倩, 王磊, 等. 肠道气泡堆积对银鲷组织抗氧化能力与溶菌酶活力的影响. *海洋渔业*, 2021, 43(2): 201–208]

(编辑 马璀璨)

Cloning and Expression of Three *Pampus argenteus* Genes and the Effects of Jellyfish Feeding on Their Expression Patterns

LIAN Shiya^{1,2}, WANG Yabing¹, WANG Qian¹, CHEN Run^{1,2}, YUE Yanfeng¹,
SU Zhixing¹, LI Yunkai³, PENG Shiming^{1①}

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract In this study, three genes associated with the metabolism of *Pampus argenteus*, namely *dehydropeptidase* (*dp*), *carboxypeptidase A* (*cpa*), and *sulfotransferase* (*sult*), were cloned and evaluated using transcriptomics analysis, and their functions in the digestion and absorption of jellyfish were discussed. First, full-length cDNA sequences for *dp1*, *cpa2l*, and *sult2* were cloned using RACE and confirmed using sequencing. The total length of the *dp1* was 2 522 bp, with this transcript including an open reading frame (ORF) of 1 272 bp, a signal peptide composed of 23 amino acids, and an amide hydrolase superfamily domain. The *cpa2l* transcript was 1 421 bp long and encoded a 1 260 bp ORF. This protein consisted of a signal peptide of 16 amino acids and was characterized by a typical M14 metal carboxypeptidase family domain. *sult2* was 1 834 bp in length, producing an ORF of 714 bp, which included a typical sulfatase domain. In addition, homology evaluations of these three *P. argenteus* genes revealed that they were most similar to the bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*), and phylogenetic tree analysis showed that *dp1*, *cpa2l*, and *sult2* were all closely related to their corresponding genes from *T. maccoyii*. RT-qPCR was then used to evaluate the expression levels of these three genes in different tissues and the changes in expression patterns in response to jellyfish ingestion. These experiments revealed that *dp1* expression was naturally the highest in the liver ($P<0.05$) and significantly increased in the brain, gills ($P<0.01$), midgut, and kidney ($P<0.05$), but significantly decreased in the muscle ($P<0.05$) when compared to that in the non-feeding control. *cpa2l* expression was highest in the middle intestine in the non-jellyfish feeding group and the kidney in the jellyfish feeding group ($P<0.05$) and was shown to be significantly increased in the liver ($P<0.01$) but significantly decreased in the midgut and muscle ($P<0.01$) when compared to that in the non-feeding group. *sult2* expression was highest in the liver ($P<0.05$) and significantly increased in the midgut, brain, gill, liver, and kidney in the feeding group compared to that in the non-feeding group ($P<0.05$). Taken together, these results suggest that *dp1*, *cpa2l*, and *sult2* play important roles in nutrient digestion, absorption, and metabolism in *P. argenteus*, especially in response to jellyfish feeding. In addition, the results of the tissue expression patterns for each of these genes following jellyfish ingestion suggest that *dp1* is primarily involved in the regulation of digestion, absorption, and nutrient deposition; *cpa2l* is involved in the regulation of nutrient metabolism in the liver; and *sult2* may play an important role in the overall process of digestion, absorption, and metabolism.

Key words *Pampus argenteus*; Nutrient metabolism; Gene; Jellyfish; Expression pattern

① Corresponding author: PENG Shiming, E-mail: shiming.peng@163.com