

翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)果糖-1, 6-二磷酸醛缩酶(ALDO-C)基因定位、克隆及表达分析*

王志刚¹ 刘士力⁴ 李贤露¹ 吕卓云¹ 毛丽盈¹ 唐超然¹ 郑荣泉^{1, 2, 3}

(1. 浙江师范大学化学与生命科学学院 金华 321004; 2. 浙江省野生动物生物技术与保护利用重点实验室 金华 321004; 3. 浙江师范大学行知学院 金华 321004; 4. 浙江省淡水水产研究所 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室/浙江省淡水水产遗传育种重点实验室 湖州 313001)

摘要 翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)是大型淡水鱼类鲮鲌亚科(Abramidae)中最大的一种鱼,具有较高的经济价值。但其饲料转化率及抗病性研究相对较少,相关基因信息缺乏。本研究以翘嘴红鲌为对象,利用 RACE 技术克隆翘嘴红鲌果糖-1, 6-二磷酸醛缩酶(ALDO-C)基因,该基因 cDNA 全长 1945bp,其中 ORF 区 975bp,编码 325 个氨基酸,5'非编码区 933bp,3'非编码区 37bp。通过实时荧光定量 PCR 检测了 ALDO-C 在不同组织中相对表达水平。发现 ALDO-C 基因在翘嘴红鲌的肾、肝、肌肉、性腺中均有表达,且在肾中表达量最高,显著高于其他组织。同时采用石蜡切片、H.E 染色和原位杂交染色,观察分析翘嘴红鲌的肾组织显微结构和 ALDO-C 基因的表达定位,结果表明,ALDO-C 在鱼类肾单位和集合管结构、调节肾组织水平衡及抗病性方面有重要作用。可以考虑将翘嘴红鲌醛缩酶 C 基因作为生长发育及抗病性相关的候选基因,用于翘嘴红鲌的分子辅助育种,以期今后的研究提供理论基础。

关键词 翘嘴红鲌; ALDO-C; 肾; 原位杂交

中图分类号 Q786; S917 doi: 10.11693/hyhz20190300049

翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*),隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae),体型较大,是大型淡水经济鱼类鲮鲌亚科(Abramidae)中最大的一种鱼。其肉质鲜美,鳞下富含脂肪,氨基酸含量高而备受青睐(Baruselli *et al.*, 2010)。蛋白质是饲料中最昂贵且对鱼类生长影响较大的组分(Kim *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002)。翘嘴红鲌最大生长的饲料蛋白质水平为 48%—54% (王桂芹, 2005),一般肉食性鱼类的最适蛋白质需求量为 40%—53% (Khan *et al.*, 1993; 钱雪桥等, 2002)。翘嘴红鲌是无胃的鲤科肉食性鱼类,对蛋白质的利用能力不是很高(赵吉伟等, 2001; 王桂芹等, 2004)。因此翘嘴红鲌饲料转化率相关的基因克隆和饲料转化率较高品种的培育对翘嘴红鲌养殖业的发展具有重要意义。

果糖-1, 6-二磷酸醛缩酶(fructose-1, 6-bisphosphate aldolase, ALDO)是生物体新陈代谢过程中的一种关键的酶(Rutter *et al.*, 1966; Penhoet *et al.*, 1996),醛缩酶普遍存在于动植物体内,在一些高等植物的线粒体、叶绿体中已经发现了多种醛缩酶(Martin *et al.*, 1998)。在脊索动物中发现有三种醛缩酶,分别为 A 型、B 型、C 型三种,它催化 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮的醇醛缩合反应可逆的生成果糖-1,6-二磷酸。该反应是生物体内碳代谢和糖代谢途径中的一步重要反应,直接影响生物体内能量的积累(Fujita *et al.*, 2014; Ji *et al.*, 2016; Cao *et al.*, 2017)。

本研究采用 RACE 技术成功克隆翘嘴红鲌 ALDO-C 基因 cDNA 全序列,并通过对其核苷酸序列的比较分析,利用原位杂交技术初步探究 ALDO-C 基

* 浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项, 2016C02055-1 号。王志刚, 硕士研究生, E-mail: 623474593@qq.com

通信作者: 郑荣泉, 博士, 教授, E-mail: zhengrq@zjnu.cn

收稿日期: 2019-03-10, 收修改稿日期: 2019-04-14

因在翘嘴红鲌中的功能, 以期为翘嘴红鲌人工选育奠定技术基础, 同时为鲌亚科鱼类起源及进化机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的翘嘴红鲌均从浙江省淡水所同塘养殖的10月龄翘嘴红鲌(4尾亲本繁殖)中随机选取3健康、无病的鱼, 取脑、肾、肌肉、性腺、肝等组织置于1.5mL冻存管中经液氮速冻后保存于-80°C。3'RACE: SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)。RNA extraction with TRIzol。

1.2 RNA 提取及检测

根据组织基因 RNA 提取试剂盒说明书提取样本 RNA, 随后分别进行1%琼脂糖凝胶电泳和 Drop2000 分光光度计检测 RNA 质量和浓度。其 $OD_{260}/OD_{280}=2.038$, RNA 浓度为 $1.1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

1.3 cDNA 的合成

根据 PrimeScript RTase 试剂盒说明书将提取的 RNA 进行反转录合成 cDNA, 反转录体系为 Oligo dT Primer or Random 6 mers $1\mu\text{L}$, dNTP Mixture (10mmol/L each) $1\mu\text{L}$, 模板 RNA $5\mu\text{L}$ 以下(视浓度而定, 可变), 补足 RNase Free dH_2O $10\mu\text{L}$, 65°C 保温 5min 后, 冰上迅速冷却至少 1min。之后再加入 $5\times$ PrimeScript II Buffer $4\mu\text{L}$, RNase Inhibitor $0.5\mu\text{L}$, PrimeScript II RTase $1\mu\text{L}$, RNase Free dH_2O $4.5\mu\text{L}$, 混

匀, 42°C 反应 30—60min, 95°C 反应 5min, -80°C 保存。

1.4 翘嘴红鲌 ALDO-C 基因 cDNA 克隆

将3组织来源的 cDNA 进行混合, 以之为模板, 利用 A-F1/A-R1, A-F2/A-R2(表1)进行高保真 PCR 扩增, 反应条件为: 94°C 5min; 35 cycles of 94°C 30", 60°C 30", 72°C 2'; 72°C 5'。电泳结果显示有较为特异性的 PCR 条带, 对条带进行割胶回收, 所有回收片段 $30\mu\text{L}$ 洗脱, $4\mu\text{L}$ 电泳检测。回收的 PCR 条带单一, 浓度适中。对其进行双向测序。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

根据翘嘴红鲌 RACE 序列所得氨基酸序列, 用 Primer3 Input 设计引物 qALDO-F、qALDO-R(表1), 扩增目的片段为 88bp, 保持与内参基因 β -actin 长度大致相同(Bai *et al.*, 2014)。反应程序 qRT-PCR 分析采用 Real-time PCR 试剂盒 KOD qPCR Mix 进行。 $20\mu\text{L}$ 反应体系: cDNA 模板 $2\mu\text{L}$, KOD qPCR Mix $10\mu\text{L}$, 上游引物和下游引物($10\mu\text{mol/L}$)各 $0.8\mu\text{L}$, 以 ddH_2O 补充至 $20\mu\text{L}$ 。放入 ABI StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪。扩增程序如下: 95°C 30s; 95°C 5s, 60°C 30s, 40 个循环; 95°C 15s, 60°C 1min, 95°C 15s 获得溶解曲线。内参基因为 β -actin, 每个孔做 3 个技术重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法(Livak *et al.*, 2001)分别计算其在各个组织中的相对表达量, 重复做 3 次独立反应。相关引物序列见表 1, 使用 Origin8 软件绘制柱状图。

表 1 翘嘴红鲌 ALDO 引物序列
Tab.1 The primer sequences of ALDO in *E. ilishaeformis*

引物	序列(5'—3')	备注
A-F1	CTCCCTCAGAGTTGGCAATCATG	3'RACE
A-R1	GACAACCCTAAAGTACAGAAG	3'RACE
A-F2	CCAGCTTCCGCCAGCCAATAGTATAG	3'RACE
A-R2	GAGAGGGAGAGCATGATACACTC	3'RACE
A-F3	TAAGTCATTCCAATTCAGGCAC	3'RACE
qALDO-F	CCCAGTACAAGAAGGACGGA	荧光定量
qALDO-R	GCATAACGGGCCAGAACATT	荧光定量
β -actin	TCAGGGTGTGATGGTTGGTATGG AGGGGCCACACCACGGAGTTCATT	对照

1.6 原位杂交

首先使用二甲苯溶液进行 3 次脱蜡反应, 每次 5min。反应结束后, 利用乙醇去除溶液中的二甲苯, 乙醇(100%, 96%, 70%)依次上下浸洗 10 次, 反应

5min; 加入 PBS 混合反应 2—5min。将切片斜置(标记末端向下), 置于空气中干燥。其次, 进行蛋白酶处理。将 40mL $2\times\text{SSC}$ 加入试管中, 水浴预热, 再加入 1g 蛋白酶 K, 直至完全溶解, 配得浓度为 $25\text{mg}/\text{mL}$

的蛋白酶 K 消化溶液; 将配制好的蛋白酶 K 溶液加入染色缸, 37°C 水浴槽中预热, 孵育 20min; 在室温下利用 2×SSC 漂洗切片 3 次, 每次 1min; 进行梯度酒精脱水(-20 预冷), 乙醇(70%, 96%, 100%)依次上下浸洗 10 次, 反应 1min。再次, 杂交反应。在每张载玻片上滴加 50—100μL 的杂交液(探针浓度为 10μm, ALDO-C 探针序列: 5'-TCACCGCATCGTGGCACCTGGCAAGGGCCTCCTGGCTGCAGATGAGTCCA-DIG-3'); 盖上 22×22 盖玻片, 用胶水封片(防止干片), 并置于杂交仪上, 95°C 5min, 37°C, 反应 12—16h。反应结束后, 用镊子小心的把封片胶撕掉(避免玻片刮花组织样本), 把玻片放入室温 5×SSC 中, 根据杂交温度在如下溶液梯度中洗片: 5×SSC 5min 37°C; 1×SSC 5min 37°C; 0.2×SSC 5min 37°C; 0.2×SSC 5min 室温。室温下加入 1×PBS 混合反应 5min。接着, 进行免疫检测。反应体系如下: 将玻片甩干, 在室温湿盒上滴加封闭液, 封闭 15min; 用纸吸干封闭液, 每张切片使用 30—60μL 罗丹明抗-地高辛抗体或 FITC 卵白素, 室温下孵育 1h; 室温下 1×PBS 洗 3 次, 每次 2min; 取出切片, 斜置切片使液体排出(Lim *et al.*, 2017)。最后, 对细胞核进行染色。每张切片加 DAB 显色液/DAPI 染色液, 覆盖盖玻片并在室温下孵育 2—5min (Somfai *et al.*, 2006); 用苏木精衬染, 酒精脱水, 二甲苯透明, 树脂封片后显微镜拍照(为防淬灭, 封片剂封片后荧光显微镜拍照)。

1.7 生物信息学分析

测序所得序列通过 NCBI Blast 进行对比所得序列相似度跟草鱼较高, 则认为是翘嘴红鲌序列, DNAMAN6.0 进行序列拼接获得全长, 利用 NCBI ORF Finder 查找基因开放阅读框。预测信号肽, 计算分子量等电点, 以及分析蛋白理化性质和功能位点预测等氨基酸序列分析参照艾加林等(2018)方法进行分析。

从 GenBank 下载草鱼 *Ctenopharyngodon idella* GenBankK: M192252.1, 白鲢 *Hypophthalmichthys molitrix* GenBank: HM124741.1, 斑马鱼 *Danio rerio* GenBank: AF533647.1, 金鱼 *Carassius auratus* GenBank: U36777.1, 墨西哥脂鲤 *Astyanax mexicanus* Sequence: XM 007259600.3, 橙线雀 *Acanthochromis polyacanthus* XM 022214917.1, 普氏野马 *Equus przewalskii* XM 008527762.1, 人 *Homo sapiens* XM 011524556.2 的氨基酸序列, 用邻位法 1000 次构建系统进化树。使用 GENEDOX.EXE 进行氨基酸序列对比。

2 结果

2.1 ALDO-C 基因克隆与分析

以翘嘴红鲌的 cDNA 为模板, 用 RACE 等技术克隆翘嘴红鲌脑组织的 ALDO-C 基因, 获得 ALDO-C 基因全长 cDNA1945bp, 其中 ORF 区 975bp, 5'非编码区 933bp, 3'非编码区 37bp(如图 1)。ALDO-C 蛋白由 325 个氨基酸组成, 其分子量(Mw)和等电点(pI)分别为 80430.16 和 5.04。NetNGlyc 分析显示翘嘴红鲌 ALDO-C 基因的编码蛋白不存在 O-糖基化位点。通过 ProP 进行蛋白酶水解位点分析显示: 翘嘴红鲌 ALDO-C 氨基酸序列无预测信号肽裂解位点, 也无预测的前肽裂解位点。采用 NetPhos 3.1 和 NetNGlyc 1.0 预测功能位点, 结果显示, 翘嘴红鲌 ALDO-C 氨基酸序列中有 8 个丝氨酸磷酸化位点、13 个苏氨酸磷酸化位点和 3 个酪氨酸磷酸化位点。SOPMA 分析表明, 翘嘴红鲌 ALDO-C 氨基酸二级结构中 α-螺旋占 50%、延伸链占 14.51%、β 转角占 6.48%、无规则卷曲占 29.01%。用 TMHMM 软件对 ALDO 氨基酸序列的跨膜结构域进行预测, ALDO-C 编码的蛋白整条肽链均位于膜外, 即 ALDO 蛋白不存在跨膜结构域。蛋白质疏水性/亲水性的预测和分析是进行蛋白质二级结构预测及功能域划分的一个必要过程。运用 ProtScale 预测 ALDO-C 氨基酸序列的疏水性/亲水性, 结果表明多肽链第 954 位的 Thr 具有最低分值-0.600, 第 607 位 Cys 具有最高分值 2.267, 依据氨基酸分值越低亲水性越强, 分值越高氨基酸疏水性越高的规律可以看出第 607 位的 Cys 疏水性较强, 第 954 位的 Thr 亲水性较强; 就整体看, 疏水性氨基酸均匀分布在整条肽链中, 且多于亲水性氨基酸, 因此, 整个多肽链表现为疏水性, 无明显的亲水区域, 可认为 ALDO 是疏水性蛋白。

2.2 翘嘴红鲌 ALDO-C 序列比对及同源性分析

使用 DNAMAN8.0 进行多重序列同源比对, 将 ALDO-C 基因编码的氨基酸序列与部分鱼类的 ALDO-C 基因进行比对, 并计算 ALDO-C 蛋白序列与比对序列之间的同源相似性。Blast 结果显示, 翘嘴红鲌 ALDO-C 基因与草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)相似度为 97.13%, 与斑马鱼(*Danio rerio*)同源性为 90.67%, 与鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)同源性 97.33%, 与鲤科同源性在 90%—98%之间, 与鲢鱼同源性最高(图 2)。ALDO-C 基因属于 ALDO 家族基因成员。进化树结果如图 3 所示, 该基因的系统进化关系与传统的物种进化地位基本一致。

```

AAGGGCATC CTGGCTGCA GATGAGTCC ACAGGTAGT ATGGCAAAG CGCCTGAAC CCAATCGGC
                                     M A K R L N P I G
GTCGAGAAC ACTGAGGAG AACCGCCGT CTTATCGC CAGATCCTT TTCTCTGCT GACGAGCGC
V E N T E E N R R L Y R Q I L F S A D E R
ATTGACAAG TGCATTGGT GGTGTTATC TTCTCCAC GAGACCCTC TACCAGAAC GCTGATGAT
I D K C I G G V I F F H E T L Y Q N A D D
GGCAGATGC TTTGCCAAA ATGATCAAG GACAGGGGC ATCGTTGTG GGAATCAAG GTTGACAAA
G T C F A K M I K D R G I V V G I K V D K
GGTGTCTGC CCTCTGGCA GGAACAAAC GGAGAGACC ACAACACAG GGGCTTGAT GGCCTGTCA
G V V P L A G T N G E T T T Q G L D G L S
GAACGCTGT GCTCAGTAT AAGAAAGAC GGAGCAGAC TTTGCCAAG TGGCGCTGT GTGCTGAAG
E R C A Q Y K K D G A D F A K W R C V L K
ATCAGTGAG ACCACTCCC TCAGAGTTG GCAATCATG GAGAACGCT AACGTTCTG GCCCGTTAT
I S E T T P S E L A I M E N A N V L A R Y
GCCAGCATC TGCCAGCAG AATGGCATT GTGCCATT GTGGAGCCA GAGATTTTA CCTGATGGT
A S I C Q Q N G I V P I V E P E I L P D G
GACCACGAC TTGAAGCGC TGCCAGTAT GTTACAGAG AAGGTCCTT GCTGCCTGC TACAAGGCC
D H D L K R C Q Y V T E K V L A A C Y K A
CTGTCTGAC CATCATGTC TATCTGGAG GAACTCTT CTGAAACCC AACATGGTG ACAGCTGGT
L S D H H V Y L E G T L L K P N M V T A G
CATGCCTGC CCCACAAA TATAACAGT CAGGAAATT GCCATGGCA ACAGTGACA GCCTTGCCG
H A C P T K Y N S Q E I A M A T V T A L R
CGCACCGTT CCCCTGCA GTAACAGGT GTGACTTTC CTCTCTGGA GGTCAGAGT GAGGAGGAG
R T V P P A V T G V T F L S G G Q S E E E
GCATCCGTC AACCTGAAT GCCATCAAC AACTGCCCT CTGACAAA CCCTGGGCC CTCACCTTC
A S V N L N A I N N C P L T K P W A L T F
TCTTATGGA CGTGCCCTG CAGGCCTCT GCCCTAAAC GCCTGGCGC GGAGTCAAG GACAATGAG
S Y G R A L Q A S A L N A W R G V K D N E
AAGGCCGCC ACAGAGGCG TTCATCCAG CGTGCTGAG GCTAATGGA TTGGCTGCT CAGGGAAG
K A A T E A F I Q R A E A N G L A A Q G K
TACGTCTCC AGTGAACT GGTGGAGCA GCAGGACAG TCCCTTTT GTGGCCAAT CATGCCTAC
Y V S S G T G G A A G Q S L F V A N H A Y
TGA

```

图 1 翘嘴红鲌 *ALDO-C*cDNA 序列及编码氨基酸序列

Fig.1 The sequence of *ALDO-C* cDNA and the coding amino acid sequence of *E. ilishaeformis*

2.3 *ALDO-C* 基因在不同组织中的表达结果

定量 PCR 扩增得到的 *ALDO-C* 基因长度为 160bp, 以翘嘴红鲌 β -actin 基因为对照, *ALDO-C* 基因在肾、肝、肌肉、性腺中均有表达, 在脑中微量表达, 且在肾中表达量最高, 显著高于其他组织(图 4)。肌肉中表达量高于肝和性腺($P < 0.05$), 肝和性腺中的表达没有显著差异($P > 0.05$)。

2.4 翘嘴红鲌 *ALDO-C* 基因组织定位

肾参与机体代谢废物的排出、水盐代谢及酸碱平

衡等过程(沈文, 2016)。H.E 染色结果: 细胞核被苏木精染成鲜明的蓝色, 软骨基质、钙盐颗粒呈深蓝色, 黏液呈灰蓝色。细胞浆被伊红染成深浅不同的粉红色至桃红色, 胞浆内嗜酸性颗粒呈反光强的鲜红色。胶原纤维呈淡粉红色, 弹力纤维呈亮粉红色, 红细胞呈橘红色, 蛋白性液体呈粉红色(Sun *et al*, 2014)。肾细胞界限较清晰, 着色较浅近端小管在肾小体周围分布较多(图 5a)。原位杂交定位结果显示, 阳性表达部位呈棕色或棕黄色。阳性表达部位呈棕色或棕黄色,

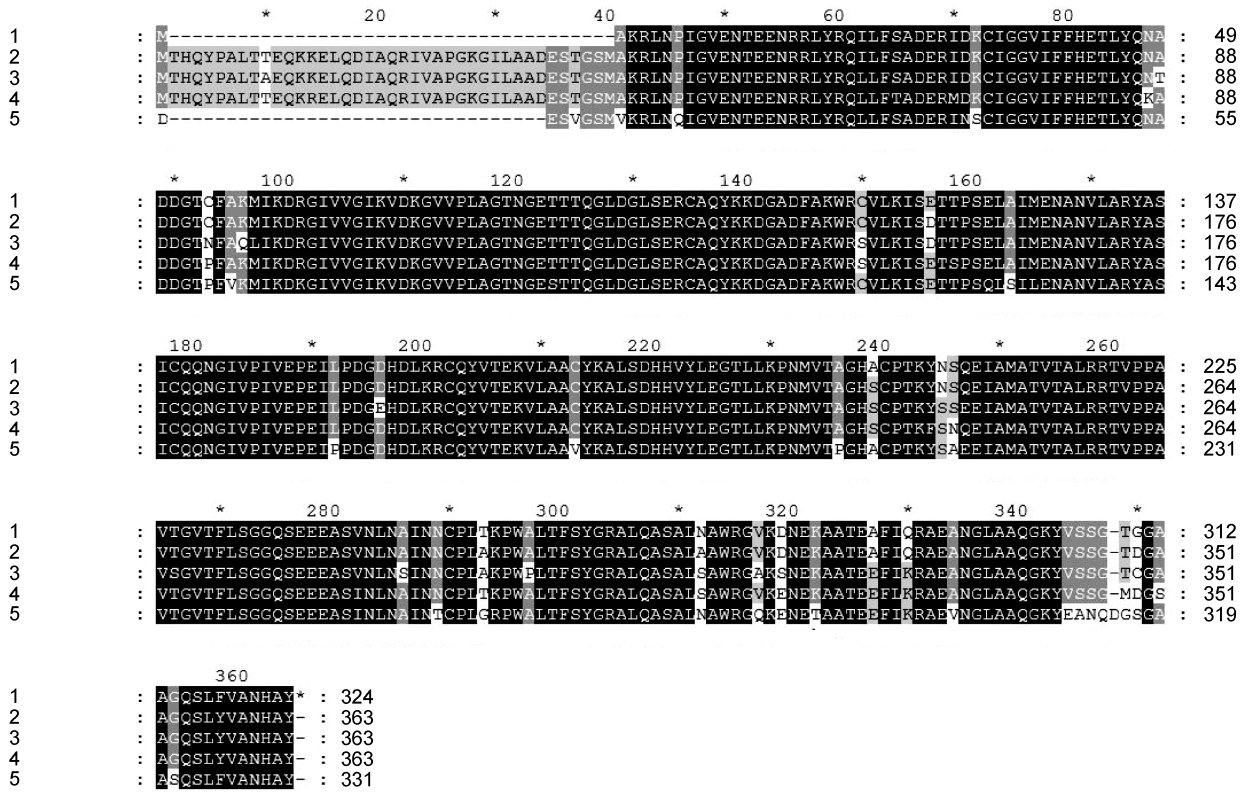


图 2 不同物种 ALDO-C 蛋白序列比对分析

Fig.2 The alignment of ALDO-C protein sequences in different species

注: 1. *Erythroculter ilishaeformis*; 2. *Ctenopharyngodon idella*; 3. *Danio rerio*; 4. *Carassius auratus*; 5. *Amia calva*

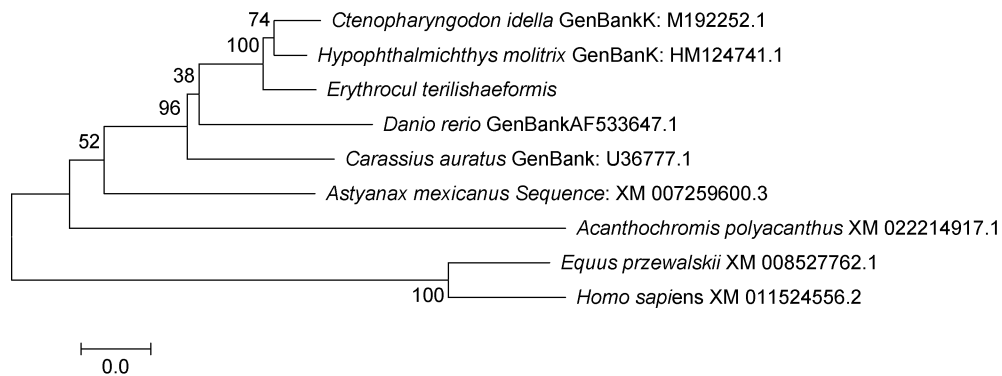


图 3 基于 ALDO-C 基因氨基酸序列构建的翘嘴红鲌及其他鱼类的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of *E. ilishaeformis* and other fishes based on the amino acid sequence of ALDO-C gene

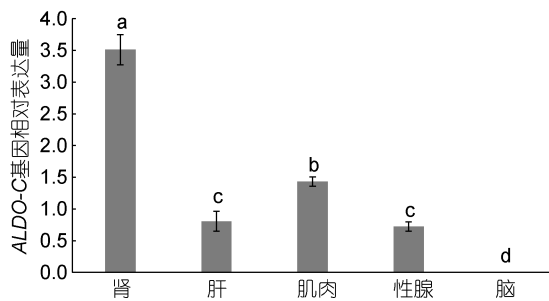


图 4 ALDO-C 基因相对表达量

Fig.4 Relative expression of ALDO-C gene

ALDO-C 在翘嘴红鲌肾近端小管中呈强阳性表达(图 5b), 在远端小管和集合管中呈弱阳性表达。

3 讨论

近年来, 翘嘴鲌养殖规模的不断扩大, 浙江省养殖面积已达到 2000hm² 以上(刘士力等, 2017)。养殖水环境差, 病害多、鱼价低迷, 而配合饲料的价格又不断上涨, 养殖户效益普遍下降, 因此选育出抗病性强及饲料转化率高的新品种具有重要的经济意义。而

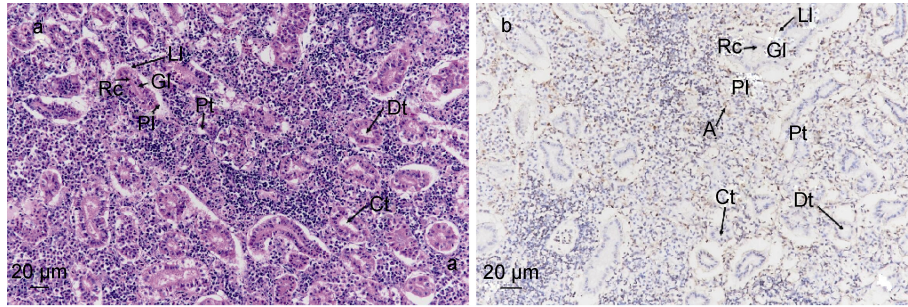


图5 翘嘴红鲌肾中 *ALDO-C* 基因的组织表达定位

Fig.5 Tissue expression of *ALDO-C* gene in the kidney of *E. ilishaeformis*

注: a. 肾 H.E 染色 200×; b. 肾原位杂交对照组。C1. 集合管; Dt. 远端小管; Gl. 肾小球; LI. 肾小囊脏层; Pt. 近端小管; Rc. 肾小体; A. *ALDO* 在集合管的表达

分子标记辅助育种被认为是最有效的育种方式之一(孙效文等, 2009)。

果糖 1, 6-二磷酸醛缩酶催化果糖 1, 6-二磷酸可逆的裂解为两个丙糖, 磷酸二羟丙酮和 3-磷酸甘油醛。该反应既存在于糖酵解/糖异生途径中又存在于磷酸戊糖循环途径中, 为生物体物质合成代谢提供能量 ATP 和底物, 因此果糖 1, 6-二磷酸醛缩酶对细胞生命活动起到至关重要的作用(张芑芑等, 2001; Barik, 2019)。Wang 等(2019)通过 *ALDO-B* 的异位表达降低癌细胞中的 FBP 水平破坏氧化还原稳态, 阻止癌症增殖。该酶在酶在糖信号、激素和胁迫响应过程中具有重要的功能。在脊椎动物中鉴定出三种醛缩酶同工酶, 其编码不同的基因(Lebherz *et al*, 1969)。醛缩酶 A 参与糖酵解骨骼肌和早期胚胎发育; 醛缩酶 B 参与肝脏、肾脏和胃肠道中的葡萄糖代谢; 醛缩酶 C 主要作为糖酵解关键酶(Lebherz *et al*, 1969)。醛缩酶的结构和功能已初步在人类和小鼠中进行了研究, 重点研究醛缩酶 B 基因突变与遗传性果糖不耐症(Cross *et al*, 1988)。此外, 醛缩酶 A 的上调在肝癌患者的肝组织中观察到 C 基因和醛缩酶 B 基因的下调(Schapira *et al*, 1963)。在鱼类研究中, 已在鲟鱼(Llewellyn *et al*, 1995)和大西洋鲑(Llewellyn *et al*, 1998)中克隆得到醛缩酶 B 基因, 在金鱼克隆得到醛缩酶 C 基因(Berardini *et al*, 1997)。曹婷婷等(2012)对草鱼的 EST 库中醛缩酶 B 基因编码区序列片段进行扩增, 测序对比等获得了三个 SNP 位点。用 296 尾草鱼进行生长性状关联分析, 结果显示三个位点两两组成的 7 种双倍型在体质量、体宽、体长的 5 个生长重要指标上有显著差异, 结果得出醛缩酶 B 可以作为草鱼育种的候选基因。目前为止, 还少有报道证明 *ALDO-C* 基因在鱼类生长发育及抗病性过程中发

挥重要功能。

本研究通过 RACE 技能成功克隆 *ALDO-C* 基因, 获得 *ALDO-C* 基因全长 cDNA 1945bp, 其中 ORF 区 975bp, 5'非编码区 933bp, 3'非编码区 37bp。ALDO-C 蛋白由 325 个氨基酸组成。其分子量(Mw)和等电点(pI)分别为 80430.16 和 5.04。翘嘴红鲌 ALDO-C 氨基酸序列中有 8 个丝氨酸磷酸化位点、13 个苏氨酸磷酸化位点和 3 个酪氨酸磷酸化位点, 这些位点对该基因功能的实现有很大的影响, 为 *ALDO-C* 功能的研究提供结构基础。该氨基酸的二级结构有助于更深一步研究该蛋白质的稳定性结构、主要定位及功能作用的发掘。同时通过 qRT-PCR 检测 *ALDO-C* 在翘嘴红鲌各组织中的表达量。选取最高表达组织, 进行原位杂交基因定位, 检测到 *ALDO-C* 在翘嘴红鲌肾近端小管中呈强阳性表达, 在远端小管和集合管中呈弱阳性表达。

肾是硬骨鱼类机体造血的主要器官, 同时也是重要的免疫器官。肾参与机体代谢废物的排出、水盐代谢及酸碱平衡等过程。肾小球滤液进入近端小管后, 滤液中大部分 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 等离子和水被重吸收, 葡萄糖、氨基酸全部被重吸收。猜测 *ALDO-C* 基因可能通过控制肾小球的重吸收功能, 来调控生物体内碳代谢和糖代谢。

4 结论

本文采用 RACE 技术克隆了翘嘴红鲌 *ALDO-C* 的 CDS 序列。通过 qRT-pcr 和原位杂交的方法确定了 *ALDO-C* 在肾中高表达, 在肾近端小管中呈阳性表达, 暗示了 *ALDO-C* 基因与肾的重吸收功能有密切关系, 其具体机制值得进一步的深入研究。该研究结果可为今后鲌类遗传育种提供参考资料。

参 考 文 献

- 王桂芹, 2005. 翘嘴红鲌蛋白质营养生理学的研究. 上海: 上海海洋大学博士学位论文, 38—42
- 王桂芹, 周洪琪, 董永利等, 2004. 翘嘴红鲌幼鱼最适蛋白需求量的研究. 吉林农业大学学报, 26(5): 556—560
- 艾加林, 栗志民, 刘建勇, 2018. 九孔鲍 *MSTN* 基因 cDNA 克隆及表达. 水产学报, 42(6): 817—827
- 刘士力, 贾永义, 蒋文枰等, 2017. 翘嘴鲌生长激素(*GH*)基因与侧翼区的克隆及分析. 浙江农业学报, 29(8): 1281—1289
- 孙效文, 鲁翠云, 贾智英等, 2009. 水产动物分子育种研究进展. 中国水产科学, 16(6): 981—990
- 沈文, 2016. 肾脏功能MRI的进展和挑战. 中华放射学杂志, 50(3): 161—164
- 张芑芑, 马为民, 杨春松等, 2001. 丙糖磷酸异构酶基因(*ALD*)、果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因(*TPI*)在鱼腥藻 7120 中的克隆. 见: 中国藻类学会第十一次学术讨论会论文摘要集. 昆明: 中国藻类学会
- 赵吉伟, 叶继丹, 2001. 饲料蛋白质含量对翘嘴红鲌生长影响的初步研究. 水产学杂志, 14(2): 21—23
- 钱雪桥, 崔奕波, 解绶启等, 2002. 养殖鱼类饲料蛋白需要量的研究进展. 水生生物学报, 26(4): 410—416
- 曹婷婷, 白俊杰, 于凌云等, 2012. 草鱼醛缩酶 B 基因部分序列的 SNP 多态性及其与生长性状的关联分析. 水产学报, 36(4): 481—488
- Bai Z Y, Lin J Y, Ma K Y *et al*, 2014. Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in the pearl mussel, *Hyriopsis cumingii*, during biomineralization. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(4): 717—725
- Barik S, 2019. How universal is the transcription regulatory moonlighting role of fructose 1,6-bisphosphate aldolase? *Journal of Theoretical Biology*, 464: 112—114
- Baruselli P S, Ferreira R M, Sá Filho M F *et al*, 2010. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(1): 67—74
- Berardini T Z, Drygas-Williams M, Callard G V *et al*, 1997. Identification of neuronal isozyme specific residues by comparison of goldfish *aldolase C* to other aldolases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 117(4): 471—476
- Cao W, Chang T J, Li X Q *et al*, 2017. Dual effects of fructose on ChREBP and FoxO1/3a are responsible for *AldoB* up-regulation and vascular remodelling. *Clinical Science*, 131(4): 309—325
- Cross N C P, Tolan D R, Cox T M, 1988. Catalytic deficiency of human *aldolase B* in hereditary fructose intolerance caused by a common missense mutation. *Cell*, 53(6): 881—885
- Fujita H, Aoki H, Ajioka I *et al*, 2014. Detailed expression pattern of *aldolase C* (*Aldoc*) in the cerebellum, retina and other areas of the CNS studied in *Aldoc*-Venus knock-in mice. *PLoS One*, 9(1): e86679
- Ji S R, Zhang B, Liu J *et al*, 2016. *ALDOA* functions as an oncogene in the highly metastatic pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 374(1): 127—135
- Khan M S, Ang K J, Ambak M A *et al*, 1993. Optimum dietary protein requirement of a Malaysian freshwater catfish, *Mystus nemurus*. *Aquaculture*, 112(2—3): 227—235
- Kim K W, Wang X J, Bai S C, 2002. Optimum dietary protein level for maximum growth of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research*, 33(9): 673—679
- Lebherz H G, Rutter W J, 1969. Distribution of fructose diphosphate aldolase variants in biological systems. *Biochemistry*, 8(1): 109—121
- Lee S M, Park C S, Bang I C, 2002. Dietary protein requirement of young Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed isocaloric diets. *Fisheries Science*, 68(1): 158—164
- Lim A S T, Lim T H, 2017. Fluorescence in situ hybridization on tissue sections. In: Wan T S K ed. *Cancer Cytogenetics: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, 119—125
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Llewellyn L, Ramsurn V P, Sweeney G E *et al*, 1995. Cloning and characterisation of a fish aldolase B gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1263(1): 75—78
- Llewellyn L, Sweeney G E, Ramsurn V P *et al*, 1998. Cloning and unusual expression profile of the aldolase B gene from Atlantic salmon. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1443(3): 375—380
- Martin W, Herrmann R G, 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiology*, 118(1): 9—17
- Penhoet E, Rajkumar T, Rutter W J, 1966. Multiple forms of fructose diphosphate aldolase in mammalian tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56(4): 1275—1282
- Rutter W J, Hunsley J R, Groves W E *et al*, 1966. Fructose diphosphate aldolase. *Methods in Enzymology*, 9: 479—498
- Schapira F, Dreyfus J C, Schapira G, 1963. Anomaly of aldolase in primary liver cancer. *Nature*, 200(4910): 995—997
- Somfai T, Dinnyés A, Sage D *et al*, 2006. Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated in vitro matured porcine oocytes after solid surface vitrification (SSV). *Theriogenology*, 66(2): 415—422
- Sun C Y, He M L, Ko W K W *et al*, 2014. Mechanisms for luteinizing hormone induction of growth hormone gene transcription in fish model: crosstalk of the cAMP/PKA pathway with MAPK-and PI3K-dependent cascades. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(2): 835—850
- Wang J, Wu Q, Qiu J X, 2019. Accumulation of fructose 1,6-bisphosphate protects clear cell renal cell carcinoma from oxidative stress. *Laboratory Investigation*, doi: 10.1038/s41374-019-0203-3

LOCATION, CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF *ALDO-C* GENE IN *ERYTHROCULTER ILISHAEFORMIS*

WANG Zhi-Gang¹, LIU Shi-Li⁴, LI Xian-Lu¹, LÜ Zhuo-Yun¹, MAO Li-Ying¹, TANG Chao-Ran¹,
ZHENG Rong-Quan^{1, 2, 3}

(1. College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; 2. Key Lab of Wildlife Biotechnology and Conservation and Utilization of Zhejiang Province, Jinhua 321004, China; 3. Xingzhi College, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; 4. Agriculture Ministry Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture / Key Laboratory of Freshwater Aquatic Animal Genetic and Breeding of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

Abstract *Erythroculter ilishaeformis*, or common skygazer, is a high-economic-valued large freshwater fish species of Subfamily Paralichthys. However, studies on the feed conversion rate and disease resistance for the culture are scarce, and the understanding of the related gene information remains poor. We cloned fructose-1,6-diphosphate aldolase (*ALDO-C*) gene by RACE (rapid-amplification of cDNA ends) technique. The full length of the gene was 1945bp, including 975bp in ORF (open reading frame) region, 325 amino acids, 933bp in 5'non-coding region, and 37bp in 3' non-coding region. The relative expression levels of *ALDO-C* in different tissues were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (polymerase chain reaction). It was found that *ALDO-C* gene was expressed in kidney, liver, muscle, and gonad, and the highest expression was found in kidney, being significantly higher than those in other tissues are. At the same time, paraffin section, H&E (hematoxylin and eosin) staining, and in situ hybridization staining were used to observe and analyze the microscopic structure of kidney tissue and the expression and location of *ALDO-C* gene. The results show that *ALDO-C* played an important role in structuring the nephron and collecting duct, regulating renal tissue water balance, and resisting against disease. Therefore, the aldolase C gene can be considered as a candidate gene relating to the growth, development, and disease resistance for molecular-assisted breeding of the fish. This study provided a theoretical basis for future research in this regard.

Key words *Erythroculter ilishaeformis*; *ALDO-C*; kidney; in situ hybridization