鲫鱼(*Carassius auratus*)半胱亚磺酸脱酸酶 *CSAD* 基因克隆及其表达研究*

李晓洁[1] 唐建洲[1, 3①] 宋 鹏[3] 伍 琴[3] 瞿符发[3] 刘 臻[2, 3] 鲁双庆[2]

(1. 湖南农业大学动物科技学院 长沙 410128; 2. 湖南省水产高效健康生产协同创新中心 常德 415000; 3. 长沙学院生物工程与环境科学院 长沙 410003)

摘要 本研究以鲫鱼(*Carassius auratus*)为研究对象, 采用巢式 PCR 和 RACE 技术克隆鲫鱼半胱亚磺酸脱酸酶 *CSAD* 基因 cDNA 序列, 并且利用实时荧光定量 PCR 检测了 *CSAD* mRNA 在鲫鱼不同组织和昼夜节律中的相对表达水平, 同时还研究了牛磺酸对鲫鱼肠道 *CSAD* mRNA 表达的影响。结果表明: (1) 鲫鱼 *CSAD* 基因 cDNA 序列包含 186bp 的 5′UTR 序列, 675bp 的 3′UTR 序列, 1503bp 开放阅读框, 编码 500 个氨基酸。同源性分析表明, 鲫鱼和鲤鱼的同源性为 97.2%。系统发育分析表明, 鲫鱼与鲤鱼之间的亲缘关系最接近, 置信度为 100。经预测, 其编码的蛋白质的分子量和等电点分别为 56.82kDa 和 5.77; (2) *CaCSAD* mRNA 在肌肉、心脏、肠道及肝脏中的表达水平较高, 在脑和鳃组织中的相对表达量较低; (3) 鲫鱼肠道 *CSAD* mRNA 的相对表达量在 6:00am 点时最高, 9:00pm 点时相对表达量最低; (4) 鲫鱼 *CSAD* 的相对表达丰度随着牛磺酸添加量的增加而逐渐下降。本研究结果不仅有助于理解鲫鱼 *CSAD* 基因的分子特征, 同时将为进一步研究鱼类 *CSAD* 营养调控功能提供理论依据。

关键词 鲫鱼; 半胱亚磺酸脱酸酶(*CSAD*); 牛磺酸; 相对表达量

中图分类号 Q78 doi: 10.11693/hyhz20170500125

牛磺酸(2-氨基乙烷磺酸)是动物生长发育的条件性必需氨基酸之一, 缺乏牛磺酸可能会导致大脑发育不全; 脂肪吸收不良、视网膜功能障碍以及肝脏功能受损。牛磺酸的合成是通过游离氨基酸在动物体内的代谢, 而且在鱼体内的合成最多。半胱亚磺酸脱酸酶(cysteine sulfinic acid decar-boxylase, *CSAD*)是氨基酸脱羧酶之一, 能催化蛋氨酸和半胱氨酸代谢途径的中间产物, 也是动物体内牛磺酸生物合成途径的关键酶, 在 1955 年大鼠肝脏中被发现(Hope, 1955)。目前关于 *CSAD* 的研究大多集中在畜禽和哺乳动物基因的分子结构与功能方面(Kim *et al*, 2006; Li *et al*, 2006; Park *et al*, 2015; Winge *et al*, 2015), 鱼类在这方面的研究还较少, 已见的报道仅有斑马鱼(Strausberg *et al*, 2002)、鲤鱼(Honjoh *et al*, 2010)等。有学者对 *CSAD* 基因在鲤鱼各组织中做了表达分析, 发现 *CSAD* 基因在肾脏中的表达水平最高, 其次是在脑、肝胰腺和鳃中(Goto *et al*, 2012)。这些研究为探讨鱼类 *CSAD* 基因的分子结构和生理功能奠定了基础。鲫鱼是我国淡水养殖的主要鱼类之一, 具有重要的经济价值, 目前有关其 *CSAD* 基因的分子特征及表达模式的研究尚未见报道, 因此本研究拟克隆鲫鱼 *CSAD* 基因, 研究鲫鱼 *CSAD* 基因时空表达模式, 探讨外源牛磺酸对鲫鱼肠道 *CSAD* mRNA 表达规律的影响, 以期为进一步认识鱼类 *CSAD* 基因及其功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验饲料

参照鲫鱼的营养饲料配方(Matsunari *et al*, 2006;

* 国家自然科学基金项目, 31372543 号; 湖南省高校产学研培育项目, 13CY031 号; 长沙市科技计划项目, ZD1601026 号, ZD1601056 号。李晓洁, 硕士研究生, E-mail: 553040977@qq.com

① 通讯作者: 唐建洲, 博士, 讲师, E-mail: 49071398@qq.com

收稿日期: 2017-05-13, 收修改稿日期: 2017-06-23

Xie *et al*, 2014; 伍琴等, 2015), 以鱼粉和豆粕作为蛋白源, 鱼油和豆油为脂肪源, 淀粉和面粉作为糖源, 配制四种等氮等能饲料(见表 1)。在鲫鱼基础饲粮中添加剂量分别为 0.0、1.0、2.5 和 4.0g/kg 的牛磺酸(牛磺酸由天根生化科技有限公司提供, 分析纯)。饲料原料拌匀粉碎后用 40 目筛过滤, 制粒前把过筛后的原料、豆油等脂肪源和水一起充分混合均匀, 然后制粒加工成直径为 1.5mm 的硬颗粒饲料, 风干后将其置于−20ºC 冰箱中储存备用。

1.2　试验鲫鱼养殖

选取大小规格一致、健康、初始体重为(29.07±0.19)g 的鲫鱼(*Carassius auratus*)(由湖南省水产科学研究所提供)为实验对象, 进行 8 周的摄食生长实验。试验以 0.0g/kg 牛磺酸为对照组, 1.0、2.5 和 4.0g/kg 牛磺酸为实验组, 共 4 个实验组, 每个实验组 4 个重复, 每个重复 50 尾鱼, 养殖用缸容积约为 0.3m^3。试验时每日定时投喂饲料 3 次, 投喂量由每天的进食情况确定, 养殖缸 24h 增氧, 水温控制在 24—27ºC, pH 值控制在 6.5—7.5。每天记录鲫鱼的死亡情况、投喂量并观察摄食情况。本试验养殖在长沙学院产学研基地室内循环养殖系统中进行。

表 1　鲫鱼饲料配方及营养成分(干物质基础)

Tab.1　Formulation and nutrient composition of the feed for *C. auratus* (DM basis)

原料	含量(%)
淀粉	20.00
面粉	8.00
鱼粉	28.00
豆粕	32.00
鱼油	3.00
豆油	3.00
氯化胆碱	0.5
磷酸二氢钙 $Ca(H_2PO_4)_2$	1.0
三氧化二铬 Cr_2O_3	0.5
甲基纤维素	2.00
预混料	2.00
合计	**100.00**
营养成分	
粗蛋白	32.18
粗灰分	7.67
粗脂肪	9.53

注: 每千克预混料中含有: VA, 0.02g; VB_1, 0.01g; VB_2, 0.015g; VB_6, 0.015g; VB_{12}, 0.008g; VC(35%), 1g; 泛酸钙, 0.04g; 肌醇, 1.2g; 叶酸, 0.01g; 生物素, 0.002g; VE, 0.4g; VK, 0.32g; VD, 0.31g; $MgSO_4{\cdot}7H_2O$, 0.6g; $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$, 0.6g; $MnSO_4{\cdot}7H_20$, 0.08g; KI, 0.0015g; Na_2SeO_3, 0.003g; $CoCl{\cdot}6H_2O$(10%), 0.005g; $CuSO_4{\cdot}5H_2O$, 0.03g; NaCl, 0.1g; 次粉, 0.15g; 沸石粉, 4.7805g; 烟酸胺, 0.1g; 抗氧化剂, 0.2g

1.3　实验方法

1.3.1　鲫鱼 *CSAD* 基因 cDNA 序列克隆　　取鲫鱼鲜活肠组织, 用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, –20ºC 保存备用。

从 NCBI 数据库中下载其他物种 *CSAD* 基因序列, 利用引物设计软件在保守区内设计鲫鱼 *CSAD* 基因特异性引物 *CaCSAD*-F/R(表 2), 引物由铂尚生物合成。以鲫鱼肠道组织的总 RNA 为模板, 逆转录成第一条 cDNA 链。以 cDNA 链为模版进行 PCR 扩增, 扩增条件为 94ºC 4min; 94ºC 30s, 56ºC 30s, 72ºC 3min, 32 个循环; 72ºC 10min。PCR 产物用 1.2%琼脂糖凝胶电泳对产物进行检测分析, 切胶回收纯化目的产物后连接至 pMD™19-T 载体, 转化到感受态细胞 *DH5α*, 利用 PCR 检测阳性克隆送铂尚生物测序。

根据已获得中间片段序列设计 2 条特异性引物 *CaCSAD*-3′F1 和 *CaCSAD*-3′F2, 使用 3′RACE 接头引物进行反转录; 用 *CaCSAD*-3′F1 与 3′RACE Outer Primer 进行第一轮巢式 PCR 反应, 反应条件为: 94ºC 4min; 94ºC 30s, 59ºC 30s, 72ºC 1min, 循环数为 25; 72ºC 10min。所得产物用无菌水稀释 10 倍后再用 *CaCSAD*-3′F2 与 3′RACE Inner Primer 进行第二轮 PCR, 反应条件同上。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 2 本研究的引物
Tab.2 The primers for the study

引物名称	序列(5′→3′)
CaCSAD-F	5′- CCTGTCATCCTCGGTTCT-3′
CaCSAD-R	5′-AGAAACAACAACCATACGGAAGAAG-3′
CaCSAD-3'F1	5′-AAACTCTGTGACTTGGAACCCTC-3′
CaCSAD-3'F2	5′-ATGGTCTTTCAGAGCGAGTG-3′
CaCSAD-5'R1	5′-GTCCGTTCCAATACCAAG-3′
CaCSAD-5'R2	5′-CTATGCGGGTCAGAGGAT-3′
3'RACE Outer Primer	5′-TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT-3′
3'RACE Inner Primer	5′-CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG-3′
CaCSAD -qPCR-F	5′-TTCTGGTTCATTCCACCCAG-3′
CaCSAD-qPCR-R	5′-TGCCACGCTTCATCATTCTC-3′
β-actin-F	5′-CCTATTGAGCACGGTATTG-3′
β-actin-R	5′-CTGTTGGCTTTGGGATTG-3′

根据已知的鲫鱼 *CSAD* 基因序列设计特异性引物 *CaCSAD*-5'R1 和 *CaCSAD*-5'R2, 利用 5'RACE CDS Primer A 接头引物进行反转录; 添加 90μL Tricine-EDTA Buffer, –20ºC 保存备用。扩增时, 用 *CaCSAD*-5'R1 与通用引物 10×UPA 进行第一轮 PCR, 扩增条件: 94ºC 30s, 72ºC 3min, 共 5 个循环; 94ºC 30s, 65ºC 30s, 72ºC 3min, 共 5 个循环; 94ºC 30s, 60ºC 30s, 72ºC 3min 共 25 个循环; 产物稀释 10 倍后再用 *CaCSAD*-5'R2 与通用引物 10×UPA 做巢式 PCR, 扩增条件及产物验证同上。

1.3.2 鲫鱼 *CSAD* 基因序列分析 使用 ORF finder 程序(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ projects/gorf)进行 ORF 区预测; 应用 MatGat2.02 软件进行序列相似性分析和同源性比对; 蛋白的分子量大小和等电点预测采用 pI/Mw 工具(http://web.expasy.org/compute_pi/); 系统进化树的构建则使用 MEGA5.05 软件(neighbor-joining)构建; 通过 SMART 预测其结构域。

1.3.3 鲫鱼 *CSAD* 基因组织表达差异性分析 根据已得的鲫鱼 *CSAD* 核苷酸序列设计荧光定量引物 *CaCSAD*-qPCR-F/R, 并利用鲫鱼的 *β*-actin 基因序列(AB039726)设计内参基因引物 β-actin-F/R; 并从在添加量为 0.0g/kg 牛磺酸的对照组中随机抓取 3 尾鲫鱼, 分别提取肌肉、肝脏、肠道、心脏、脑、鳃等 6 个组织总 RNA, 反转录成 cDNA 后进行荧光定量检测, 计

表 3 *CSAD* 基因氨基酸序列登录号
Tab.3 Amino acid sequence accession number of *CSAD*

物种名称	GenBank 序列号	序列一致性
Homo sapiens	NP_057073	61.0%
Rattus norvegicus	ACF07922	61.2%
Ochotona princeps	XP_004583244	62.0%
Macaca nemestrina	XP_011727141	57.3%
Elephantulus edwardii	XP_006883946	63.2%
Ophiophagus hannah	ETE60237	58.7%
Parus major	XP_015507533	60.0%
Gallusgallus	XP_015128899	63.2%
Danio rerio	AAI64685	88.2%
Lepisosteus oculatus	XP_006629342	67.3%
Seriola quinqueradiata	ALF39406	67.8%
Oryzias latipes	XP_011475423	65.7%
Clupea harengus	XP_012697185	73.6%
Cyprinus carpio	BAE73113	97.2%

算出样品中基因 *CSAD* mRNA 相对表达量并作图。

1.3.4　鲫鱼 *CSAD* 基因昼夜节律表达差异性分析　分别在 0:00、3:00、6:00、9:00、12:00、15:00、18:00、21:00、24:00 时间点在添加量为 0.0g/kg 牛磺酸的对照组中随机抓取 3 尾, 取其肠道组织, –80ºC 保存, 用于鲫鱼 Total RNA 的提取, 进行鲫鱼 *CSAD* 基因的节律表达分析, 实验条件及数据处理同上。

1.3.5　牛磺酸对鲫鱼 *CSAD* 基因表达水平的影响　养殖实验结束后, 每组鱼随机取 3 尾取其肠道组织, –80ºC 保存, 用于鲫鱼 Total RNA 的提取, 利用实时荧光定量 PCR 仪测定鲫鱼 *CSAD* 基因的表达水平, 反应条件及数据处理同上。

2　结果与分析

2.1　鲫鱼 *CSAD* 基因的克隆与分析

以鲫鱼的 *CSAD* cDNA 为模板, 用 RACE 等技术克隆鲫鱼肠道组织的 *CSAD* 基因, 获得鲫鱼 *CSAD* 基因 cDNA 序列大小为 2364bp (图 1 为部分序列), ORF 序列为 1503bp, 5'非编码区(Untranslated region, UTR)为 186bp, 3'UTR 为 675bp。*CSAD* 蛋白由 500 个氨基酸组成, 其分子量和等电点分别为 56.82kDa 和 5.77。通过 SMART 预测, 发现鲫鱼 *CSAD* 蛋白含有一个 Pyridoxal_deC 结构域。本研究中, 我们选取具有代表性物种的 *CSAD* 氨基酸序列(在 NCBI 中的登录号见

```
   1 TCTAATACGACTCTCTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTCCTGGGGGAATCAG
  61 GCGAGTGCATCCACGTATATATACGACCTGATCATGCGACGAGCCGTGGTATGTCTCCAG
 121 AGTTCACATAGACATAAAGAAACAGCAGAGTCTCAGTGCTGATCAGAAAGGATATTAAAC
 181 CGCACGATGAGTTCATCTGAAGAATATATTAATGGGCACGTCCACCTGGAAGAATCAGAC
   1         M  S  S  S  E  E  Y  I  N  G  H  V  H  L  E  E  S  D
 241 ATGTACGAGTCAGATGGCAAGCTGTTCCTCACGGAGGCTTTCAATGTGATTCTGGAGGAG
  19  M  Y  E  S  D  G  K  L  F  L  T  E  A  F  N  V  I  L  E  E
 301 ATACTTCACAAAGGAACTGACTTGAAGGAGAAGGTGTGTGAGTGGAAAGATCCCGATCAG
  39  I  L  H  K  G  T  D  L  K  E  K  V  C  E  W  K  D  P  D  Q
 361 CTGAGAGCCCTTCTGGACCTCGATCTCCGAGAACATGGAGAATCTCACGAGCAGTTACTG
  59  L  R  A  L  L  D  L  D  L  R  E  H  G  E  S  H  E  Q  L  L
1561 ATGGTGGGATACCAGCCCATGGATGGACACGTCAACTTCTTCCGTATGGTTGTTGTTTCT
 459  M  V  G  Y  Q  P  M  D  G  H  V  N  F  F  R  M  V  V  V  S
1621 CCTCAGCTGACCACCAAGGACATGGATTTCTTCCTTGATGAGATAGAGGACCTAGGGAAG
 479  P  Q  L  T  T  K  D  M  D  F  F  L  D  E  I  E  D  L  G  K
1681 GACCTGTAGTTAGTTTGAATATATATGGTCTACCAATCACATTACCCCCTCATCTCATCA
 499  D  L  *
1741 TCTTTAAATTTGCGATAAGGTTGCTAAAATGTTGACTTATAAGCGGTACATAATACTGAC
1801 TTCAATGAGTAAGCGAGCAAAAGAAGTATGCATCTACAGAGGTCATAAAGTGAATGAATC
1861 TCATAGATTCTGGCCCACCTAAGTATTGAATTCATTTGGAAAACCCAGTTTTAGGTAGCC
1921 TGTTAGAGCCTTTACTAATGAGCCTGATTATATAAATCATGTGTATTAAATAAGGGCAAC
1981 ATCCAAGATGTGCACTACAGAGGCCACTACTGAGACGCACTGTGTCTGTAAACGTGATGT
2041 CAGCAAAACTGAATGTGCATTGTGCAAAATGATTCACAGGAGGAAAGCGTTTCTGATTGG
2101 CTAAATGCATGGGCTGTTCCCCGTTCTCTCTCTCTTTTCTCAGAGCCAAGGGCTGTCACC
2161 AAAACAGAGTGATTTTTTAAGCACACTTGCTTCAGTGATATCTGTTAATAAGGTGATTTT
2221 ATGTGTGCTGTTGAAAAATAGCTTTACATTCAAGTATGCAAACATTTTTATTTGAGTAAA
2281 TACATTGTTGTTTAAAGGGGCCCTATTTAAAGGATATTTTTAAGTTTGGATAGAGGAAGG
2341 GATTGTGTGTATACACCACGTGTG
```

图 1　鲫鱼 *CSAD* cDNA 序列及蛋白序列预测

Fig.1　The sequence of *CSAD* cDNA and the deduced protein sequence of *C. auratus*

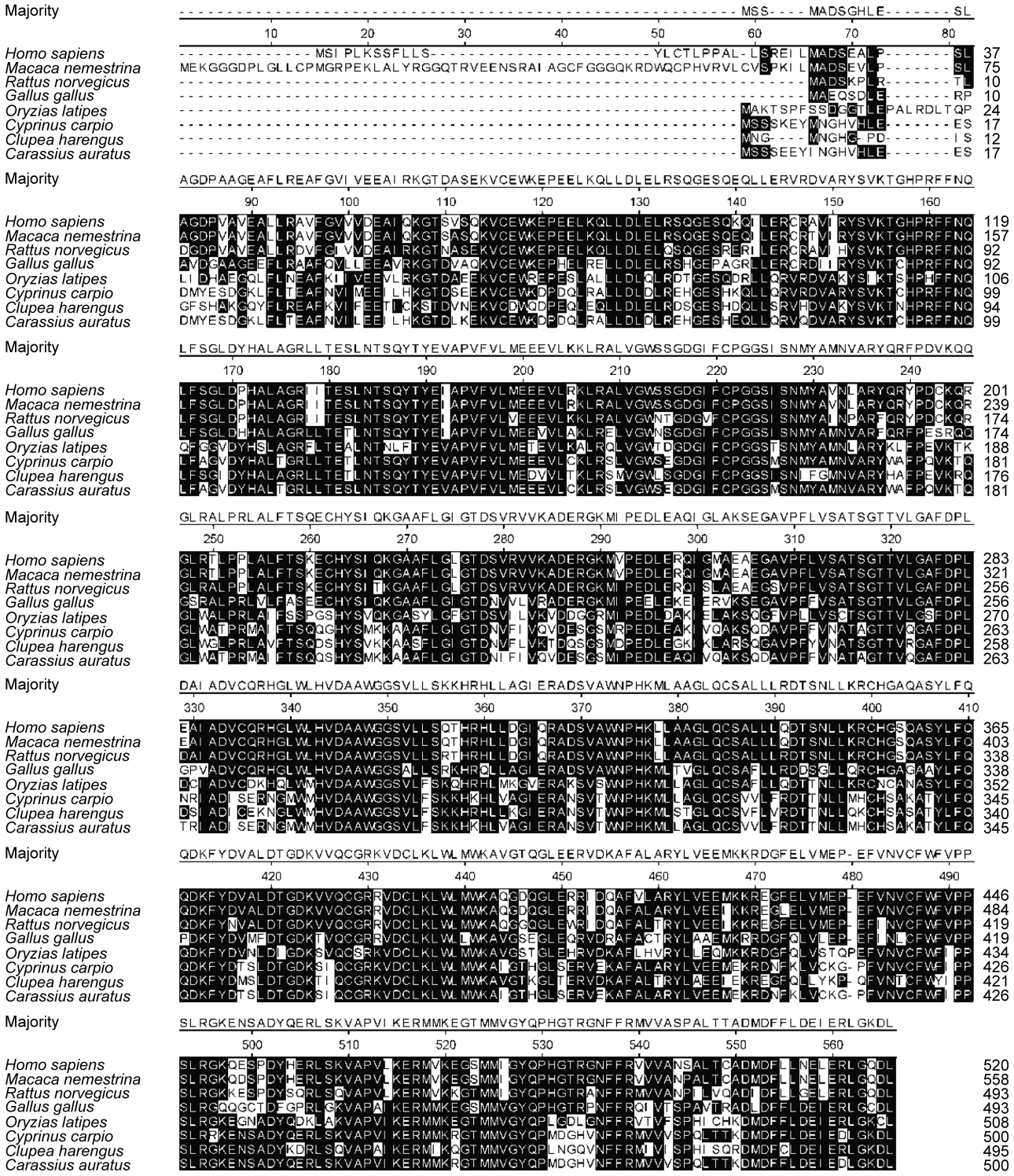


图 2 不同物种 *CSAD* 蛋白序列比对分析

Fig.2 The alignment of protein sequence of *CSAD* in different species

表 3)与鲫鱼 *CSAD* 蛋白序列进行比对分析(如图 2)。结果显示，与其他脊椎动物相比，鲫鱼 *CSAD* 与鲤鱼同源性高达 97.2%，与大西洋鲑鱼为 73.6%，与人的只有 61.0%。通过 MEGA5.05 软件用 N-J 法对来自不同物种的 *CSAD* 构建了系统进化树。结果如图 3 所示，哺乳动物、鸟类、爬行类及人形成一支，第二支主要是鱼类，系统进化树显示的亲缘关系与传统分类学基本一致。

2.2　鲫鱼不同组织 *CSAD* mRNA 的表达特征

鲫鱼 *CSAD* mRNA 在肌肉、心脏、肠、鳃、脑和肝脏等组织中都有表达，但在肌肉、心脏、肠道及肝脏中的表达较高，差异不显著(P>0.05)；在脑和鳃组织中的相对表达量最低，显著低于其他组织(P<0.05)(图 4)。

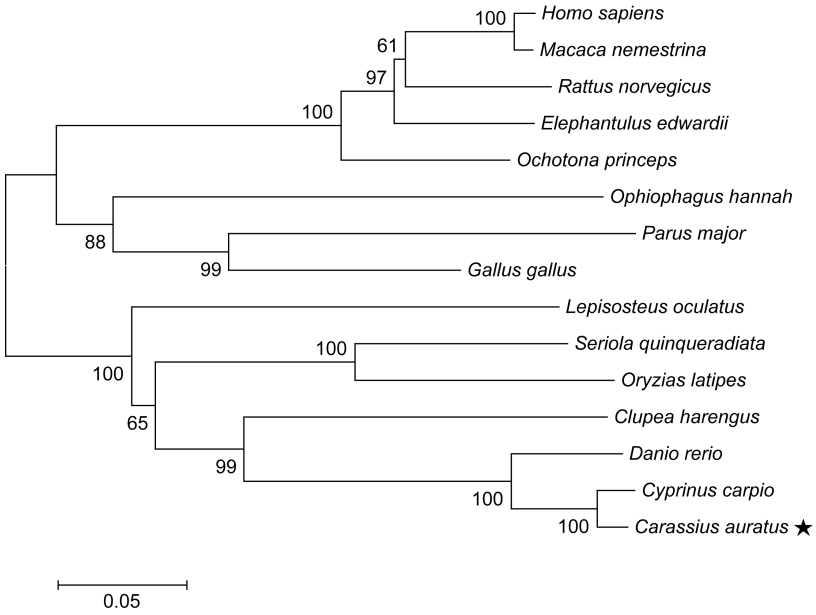


图 3　*CSAD* 基因系统进化分析

Fig.3　Phylogeny of the *CSAD*

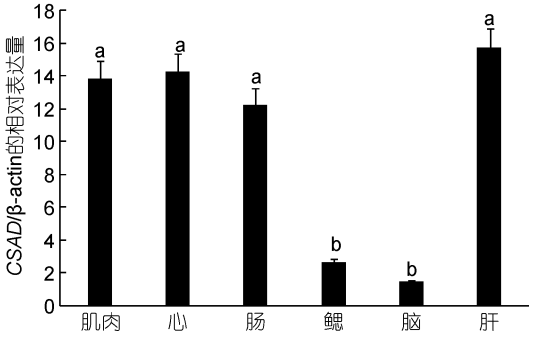


图 4　鲫鱼 *CSAD* mRNA 的各组织表达水平(n=3)

Fig.4　The expression levels of *CSAD* mRNA in different tissues from *C. auratus*

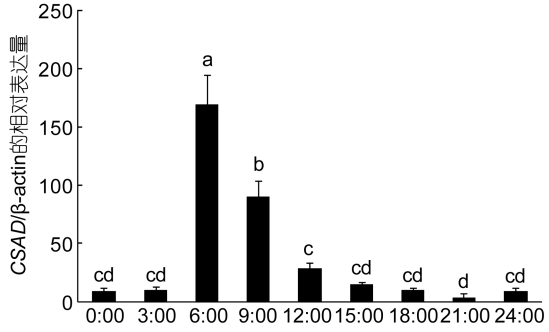


图 5　鲫鱼 *CSAD* mRNA 昼夜节律的表达水平(n=3)

Fig.5　The circadian rhythm of the expression level of *C. auratus CSAD* mRNA

2.3　鲫鱼 *CSAD* mRNA 昼夜节律的表达特征

鲫鱼肠道 *CSAD* mRNA 在一天 24h 中的相对表达量从 0:00 点开始呈现先上升后下降的趋势，且上午表达量显著高于下午和晚上，在 6:00 时 CSAD 基因表达水平最高(P<0.05)；21:00 时 mRNA 水平最低(图 5)。

2.4　牛磺酸对 *CSAD* mRNA 相对表达量的影响

肠道 *CSAD* mRNA 的相对表达量逐步降低，牛磺酸添加量为 0.0g/kg 的表达水平最高(P<0.05)；添加量为 0.25、0.4g/kg 的组相对表达量较低，显著低于其他组(P<0.05)，但其之间差异不显著(P>0.05)(图 6)。

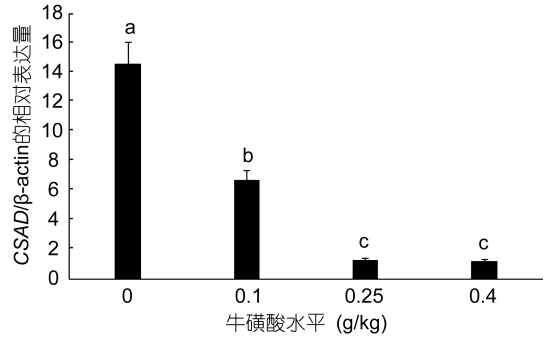


图 6　牛磺酸对鲫鱼肠道 *CSAD* mRNA 表达水平的影响

Fig.6　Effect of taurine on *CSAD* mRNA expression level of *C. auratus*

3 讨论

CSAD 是哺乳动物自身合成牛磺酸的主要限速酶之一，对半胱亚磺酸有很高的选择性和亲和力(Yang *et al*, 2010)。本研究以鲫鱼为材料，成功克隆了 *CSAD* 基因 cDNA 序列，通过生物信息学分析发现鲫鱼 *CSAD* 蛋白由 500 个氨基酸组成，包含一个保守的 Pyridoxal_deC 结构域，暗示了其可能具有高等动物同源基因相似的生物学功能。通过蛋白序列比对发现，鲫鱼与鲤鱼的同源性很高；与其他高等脊椎动物相比同源性偏低，系统进化分析发现，鲫鱼与鲤鱼亲缘关系最近，这与系统分类学方法得到的结果基本一致。

高等动物中，人们一直认为肝脏是动物机体合成牛磺酸的主要器官。近年来有研究表明，脂肪组织(Ide *et al*, 2002)、视网膜(Lin *et al*, 1985)、动物脑(Dominy *et al*, 2004)内也有 *CSAD* 基因的存在。有资料显示，通过半定量 PCR 检测 *CSAD* 在黄鳝鱼、日本石斑鱼、红鲷鱼、条斑星鲽中各组织的的表达，发现 *CSAD* 在黄鳝鱼、日本石斑鱼和红鲷鱼的幽门盲囊、肝脏中均有较高表达，而在条斑星鲽的肝脏中表达很微弱；在黄鳝鱼和日本石斑鱼的脑、鳃、心脏中表达较低，而在红鲷鱼和条斑星鲽中表达却较高；在红鲷鱼骨骼肌中不表达，而在条斑星鲽骨骼肌中表达(Haga *et al*, 2015)。本研究中鲫鱼 *CSAD* mRNA 在肌肉，心脏，肠道及肝脏广泛表达，脑和鳃中表达较低，说明来自不同鱼类的 *CSAD* 基因组织表达存在一定的差异。鲫鱼 *CSAD* 基因在肝脏中高表达，暗示了肝脏是牛磺酸主要合成器官；且鲫鱼 *CSAD* 在肠道的表达也较高，可能是因为肠道也是牛磺酸吸收的场所之一。

在自然界中，生物钟现象是普遍存在的，生物的生命活动如生理生化功能和物质能量代谢等都与生物的节律相关，它使生物呈现着规律性变化，与自然的变化规律相适应。有资料表明，小鼠胆酸合成酶 *Cyp7al* 和 *Cyp27al* mRNA 在 18:00 表达水平最高；而 *Cyp8bl* 和 *Cyp7bl* 表达丰度最高的时间点是 10:00am (徐亚沙等, 2015)，而 *CSAD* 基因在动物昼夜节律性方面尚未见报道。本实验结果显示，鲫鱼肠道 *CSAD* mRNA 的相对表达量也是呈昼夜节律性变化的，并且 *CSAD* mRNA 的表达量在 6:00 达到最高，白天表达量高，晚上比较低，这可能是由于白天鲫鱼体内代谢活动较强，牛磺酸的合成代谢加快，从而导致 *CSAD* mRNA 的表达量升高。

牛磺酸是含硫非蛋白氨基酸之一，对鱼体内的营养生理及其鱼体健康具有很大作用，它能够影响鱼类的视力和神经系统，并促进营养物质的消化吸收，提高鱼的生长性能等。有研究表明，在饲料中添加牛磺酸能够降低饲料系数，提高鱼的生产性能(Yamamoto *et al*, 2000; Takagi *et al*, 2006)；牛磺酸添加量在一定范围时，五条鲷的繁殖能力能得到提高(Matsunari *et al*, 2006)；在大菱鲆肝脏中，随着牛磺酸添加水平的增加，*CSAD* mRNA 的表达水平逐渐降低，不添加牛磺酸组显著高于添加量为 2%的牛磺酸组(齐国山, 2012)。本研究中鲫鱼 *CSAD* mRNA 随着牛磺酸添加水平的增加而表达水平逐渐降低，与上述报道结果一致。我们实验室前期对牛磺酸的转运载体也做了研究，实验结果表明随着牛磺酸添加量的增加，牛磺酸转运载体的表达量先上升后逐渐下降，暗示了鲫鱼牛磺酸转运载体和合成酶基因表达水平在体内可能存在相互调控，其具体机制值得进一步的深入研究。

4 结论

(1) 本文采用巢式 PCR、RACE 等技术克隆了鲫鱼肠道 *CSAD* 基因的 CDS 序列。

(2) 本文探讨分析了 *CSAD* 基因在鲫鱼不同成体组织、昼夜节律中的表达水平。*CSAD* 基因在肌肉，心脏，肠道及肝脏中的相对表达量相对较高，在脑和鳃组织中的相对表达量较低，且呈现节律性变化，在凌晨 6 点时相对表达量最高。

(3) 本研究结果表明饲料中添加适量的牛磺酸能使鲫鱼 CSAD 的相对表达量逐渐降低。

参 考 文 献

伍 琴，唐建洲，刘 臻等，2015. 牛磺酸对鲫鱼(*Carassius auratus*)生长、肠道细胞增殖及蛋白消化吸收相关基因表达的影响. 海洋与湖沼, 46(6): 1516—1523

齐国山，2012. 饲料中牛磺酸、蛋氨酸、胱氨酸、丝氨酸和半胱胺对大菱鲆生长性能及牛磺酸合成代谢的影响. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 43—53

徐亚沙，李书俊，吴 芹等，2015. 小鼠肝脏胆酸合成及转运基因表达的昼夜节律. 遵义医学院学报, 38(5): 474—478

Dominy J, Eller S, Dawson Jr R, 2004. Building biosynthetic schools: reviewing compartmentation of CNS taurine synthesis. Neurochemical Research, 29(1): 97—103

Goto T, Endou Y, Kitaoka Y *et al*, 2012. Distribution of cysteinesulfinate decarboxylase and cysteamine dioxygenase activities in internal organs of common carp *Cyprinus carpio*. Aquaculture Science, 56(4): 607—608

Haga Y, Kondo H, Kumagai A *et al*, 2015. Isolation, molecular characterization of cysteine sulfinic acid decarboxylase (CSD) of red sea bream *Pagrus major* and yellowtail *Seriola quinqueradiata* and expression analysis of CSD from several marine fish species. Aquaculture, 449: 8—17

Honjoh K, Matsuura K, Machida T *et al*, 2010. Enhancement of menadione stress tolerance in yeast by accumulation of hypotaurine and taurine: co-expression of cDNA clones, from *Cyprinus carpio*, for cysteine dioxygenase and cysteine sulfinate decarboxylase in Saccharomyces cerevisiae. Amino Acids, 38(4): 1173—1183

Hope D B, 1955. Pyridoxal phosphate as the coenzyme of the mammalian decarboxylase for L-cysteine sulphinic and L-cysteic acids. Biochemical Journal, 59(3): 497—500

Ide T, Kushiro M, Takahashi Y *et al*, 2002. mRNA expression of enzymes involved in taurine biosynthesis in rat adipose tissues. Metabolism Clinical and Experimental, 51(9): 1191—1197

Kim H W, Yoon S H, Park T *et al*, 2006.gene expressions of taurine transporter and taurine biosynthetic enzyme during mouse and chicken embryonic development. Advances in Experimental Medicine and Biology, 583: 69—77

Li J H, Ling Y Q, Fan J J *et al*, 2006. Expression of cysteine sulfinate decarboxylase (CSD) in male reproductive organs of mice. Histochemistry and Cell Biology, 125(6): 607—613

Lin C T, Songg X, Wu J Y, 1985. Ultrastructural demonstration of L-glutamate decarboxylase and cysteinesulfinic acid decarboxylase in rat retina by immunocytochemistry. Brain Research, 331(1): 71—80

Matsunari H, Hamada K, Mushiake K *et al*, 2006. Effects of taurine levels in broodstock diet on reproductive performance of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Fisheries Science, 72(5): 955—960

Park S Y, Schuller-Levisg, Park E, 2015. A novel cysteine sulfinic acid decarboxylase knock-out mouse: immune function. In: Marcinkiewicz J, Schaffer S eds. Taurine 9. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 803: 89—98

Strausberg R L, Feingold E A, Grouse L H *et al*, 2002.generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(26): 16899—16903

Takagi S, Murata H, Goto T *et al*, 2006. Hemolytic *suppression* roles of taurine in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed non-fishmeal diet based on soybean protein. Fisheries Science, 72(3): 546—555

Winge I, Teigen K, Fossbakk A *et al*, 2015. Mammalian CSAD andgADL1 have distinct biochemical properties and patterns of brain expression. Neurochemistry International, 90: 173—184

Xie Zg, Wang F R, Liu H Y *et al*, 2014. Effect of dietary taurine levels ongrowth performance and taurine content of *Nibea albiflora* larvae. Aquaculture International, 22(6): 1851—1862

Yamamoto T, Unuma T, Akiyama T, 2000. The influence of dietary protein sources on tissue free amino acid levels of fingerling rainbow trout. Fisheries Science, 66(2): 310–320

Yang J C, Wug F, Feng Y *et al*, 2010. CSD mRNA expression in rat testis and the effect of taurine on testosterone secretion. Amino Acids, 39(1): 155—160

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF *CSAD* IN *CARASSIUS AURATUS*

LI Xiao-Jie[1], TANG Jian-Zhou[1, 3], SONG Peng[3], WU Qing[3], QU Fu-Fa[3], LIU Zhen[2, 3], LU Shuang-Qing[2]

(1. *College of Animal Science and Technology*, *Hunan Agricultural University*, *Changsha* 410128, *China*; 2. *Collaborative Innovation Center for Efficient and Health Production of Fisheries in Hunan Province*, *Changde* 415000, *China*; 3. *Department of Biotechnology & Environment Science*, *Changsha University*, *Changsha* 410003, *China*)

Abstract　The *CSAD* (cysteine sulfinic acid decarboxylase) cDNA sequence in *Carassius auratus* was cloned using nested PCR (polymerase chain reaction) and RACE (rapid amplification of cDNA ends) techniques, and the relative expression levels of *CSAD* mRNA in different tissues and circadian rhythms fish and in the intestine of taurine-feed *C. auratus* were analyzed. The results show the following findings. (1) The cloned cDNA sequence of *CSAD* was 2364bp in length, including 186bp 5′UTR sequence, 675bp 3′UTR sequence and 1503bp open reading frame encoding 500 amino acid polypeptide. The homology analysis showed that *CSAD* gene from *C. auratus* had 97.2% uniformity with *C. carpio*. Phylogenetic analysis indicated that the *C. auratus CSAD* was most closely related to *CSAD* of *C. carpio* in confidence level of 100. The encoded protein molecular weight was predicted for 56.82kDa with a pI of 5.77. (2) The highest expression of the *CSAD* mRNA was observed in the muscle, heart, intestine, and liver, and the lowest in the brain and gill. (3) The highest expression of intestine *CSAD* mRNA was found at 6:00 am, and the lowest at 9:00 pm. (4) The relative abundance of the *CSAD* mRNA decreased gradually with the increase of taurine. Therefore, this work could deepen understanding on the molecular characteristics of *CSAD* in *C. auratus*, and provide a theoretical basis for future study on the nutritional regulation of fish *CSAD* genes.

Key words　*Carassius auratus*;　*CSAD* (cysteine sulfinic acid decar-boxylase);　taurine;　relative expression