

刘宁,陈秀荔,黄欣. 鲤科鱼类 RNase 1 基因的进化与组织表达模式[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(6): 126-133.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.06.016

## 鲤科鱼类 RNase 1 基因的进化与组织表达模式

刘宁<sup>1</sup>, 陈秀荔<sup>2</sup>, 黄欣<sup>1</sup>

1. 华中农业大学水产学院/农业农村部淡水生物繁殖重点实验室, 武汉 430070;

2. 广西壮族自治区水产科学研究院, 南宁 530021

**摘要** 为探究 RNase 1 在鱼类食性适应性进化中的作用, 对不同食性的 9 种鲤科鱼类, 包括草食性的草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 和团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)、杂食性的鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙 (*Hypophthalmichthys nobilis*)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、黄尾鲮 (*Xenocypris davidi*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 以及肉食性的翘嘴鲌 (*Culter alburnus*) 和鳊 (*Elopichthys bambusa*) 的 RNase 1 基因进行鉴定、序列特征分析、进化规律及组织表达模式分析。研究结果显示, 与哺乳动物不同, 9 种鲤科鱼类基因组中只存在 1 个 RNase 1 基因, 序列同源性高, 且具有 RNase A 超家族的序列特征, 包括 N 端信号肽序列, 6 个间隔的半胱氨酸残基, 3 个催化碱基形成的催化三联体和“CKXXNTF”序列; 系统发育树显示, 硬骨鱼和哺乳动物的 RNase 1 聚为不同分支, 鲤科鱼类单独聚为一支; qRT-PCR 结果显示, 植食性的团头鲂和草鱼、杂食性的鳙和肉食性的翘嘴鲌的 RNase 1 基因在不同组织中的表达模式各不相同, 4 种鱼类在肝脏中相对表达量高, 在团头鲂和翘嘴鲌的脾脏中表达量也高。以上结果表明, 鲤科鱼类的 RNase 1 的进化与物种食性的关联性不大, 但符合物种进化的规律。

**关键词** RNase 1 基因; 鲤科鱼类; 基因表达; 基因进化; 食性适应性

**中图分类号** Q 959.46+8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)06-0126-08

核糖核酸酶(RNase A)是一类在脊椎动物中存在的核酸水解酶。很多研究表明该基因家族的几个成员具有明显的消化、水解 RNA、抗菌及抗病毒的作用<sup>[1-4]</sup>。胰核糖核酸酶(RNase 1)属于 RNase A 超家族, 具有 RNase A 超家族的结构特征, 其蛋白序列包含 1 个内含子和 2 个外显子, 在第 2 个外显子上具有完整的 CDS(coding sequence)区<sup>[5]</sup>, 包含 6~8 个半胱氨酸形成的 2 个二硫键, 具有特有的“CKXXNTF”氨基酸序列。有关 RNase 1 在哺乳动物中研究很多, 例如人类 (*Homo sapiens*)<sup>[6]</sup>、牛 (*Bos taurus*)<sup>[7]</sup> 及叶猴 (*Pygathrix nemaeus*)<sup>[8]</sup> 等, 特别是在其基因进化以及生物学功能研究方向。RNase 1 基因在哺乳动物中普遍存在基因拷贝, 叶猴通过基因复制产生的 RNase 1B 具有与小肠一致的较低 pH 环境, 是其对植食性的一种适应<sup>[8]</sup>。Yu 等<sup>[9]</sup> 发现食肉目鼬科 (Mustelidae) RNase 1 出现基

因复制, 推测与它们的进食快又多的特点相适应。啮齿类和食肉类动物肠道中缺少帮助消化的微生物, 消化结构简单, 却广泛表现出 RNase 1 基因拷贝现象, 促使研究者们去探讨 RNase 1 基因重复所产生的新功能<sup>[10-12]</sup>。随着对高等脊椎动物 RNase 1 基因分子进化机制及食性适应性进化研究的深入, 低等脊椎动物 RNase 1 基因研究也在不断开展。

关于鱼类 RNase 1 的研究较少, 目前仅在斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[13]</sup>、大西洋鲑 (*Salmo salar*)<sup>[14]</sup> 和团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)<sup>[15-16]</sup> 等有报道。鲤科鱼类是我国分布最广、种类最多的淡水经济鱼类, 它们的食性广泛且存在差异。故本研究通过对基因组中不同食性鲤科鱼类的 RNase 1 基因进行序列和进化分析, 进一步探讨不同鲤科鱼类 RNase 1 基因结构及基因表达水平的差异, 研究鱼类 RNase 1 结构和功能的关系, 同时在不同食性鱼

收稿日期: 2021-06-28

基金项目: 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室开放基金(20-238-07); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系建设项目(CARS-45-08)

刘宁, E-mail: 1575604938@qq.com

通信作者: 黄欣, E-mail: kuale303171@mail.hzau.edu.cn

类之间阐释 RNase 1 的系统进化关系,旨在为进一步研究鱼类 RNase 1 基因提供理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

成年草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、翘嘴鲌 (*Culter alburnus*)、鳊 (*Hypophthalmichthys nobilis*) 和团头鲂来自华中农业大学鄂州水产实验基地。试验用鱼在实验室暂养 2 周,暂养期间保证溶氧充足,水温合适。样品采集前用氨基甲酸乙酯对鱼体进行麻醉,75%的乙醇消毒,在冰上采集团头鲂、草鱼、鳊和翘嘴鲌的肌肉、肝脏、脾脏、性腺、心脏、肾脏、肠、脑、鳃和血液 10 种组织迅速放入冻存管,置于液氮罐,之后转入  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

### 1.2 鲤科鱼类 RNase 1 基因的鉴定及序列特征分析

在 NCBI 数据库中下载青鳉 (*Oryzias latipes*)、斑马鱼、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 等 RNase 1 基因序列作为比对序列,在团头鲂、草鱼、鲤 (*Cyprinus carpio*)、鳊 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳊及翘嘴鲌的全基因组数据库中比对分析,鉴定出 7 种鱼类的 RNase 1 基因序列。鳙 (*Elopichthys bambusa*) 及黄尾鲴 (*Xenocypris davidi*) 的 RNase 1 基因序列由笔者所在实验室前期克隆保存。对 9 种鲤科鱼类的 RNase 1 蛋白序列进行序列分析,首先利用 BioEdit 软件进行初级序列分析和氨基酸、核苷酸序列比对,然后在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) 上 BLAST 检测氨基酸序列的相似性。使用在线软件 pI/Mw ([http://web.expasy.org/compute\\_pi](http://web.expasy.org/compute_pi)) 测定 RNase 1 蛋白质等电点及分子质量等基本物理化学性质。用在线软件 SignalP

4.1 对 RNase 1 进行编码信号肽序列的预测。用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 同源建模的方法对 9 种鲤科鱼类 RNase 1 的三级结构进行预测,之后利用 PyMOL 软件对鲤科鱼类 RNase 1 的三级结构进行可视化。

### 1.3 鲤科鱼类 RNase 1 的系统进化分析

为分析硬骨鱼类和哺乳动物 RNase 1 的进化关系,在 NCBI 数据库分别下载陆生哺乳动物、水生哺乳动物 RNase 1 序列,大西洋鲑 (*Salmo salar*) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的 RNase 1 基因序列从 Cho 等<sup>[13]</sup>的研究中获得,将上述序列与本研究鉴定的 9 种鲤科鱼类的 RNase 1 序列采用 CLC Sequence Viewer 6 软件进行多序列比对,利用 MEGA 5.0<sup>[17]</sup> 使用最大似然法 (ML) 和最大简约法 (MP),重复检测 1 000 次,构建系统发育树。

### 1.4 鲤科鱼类 RNase 1 基因表达分析

用 TRIZOL 裂解法提取团头鲂、鳊、翘嘴鲌和草鱼的心脏、脑、肾、肌肉、鳃、血液、脾脏、性腺、肠和肝脏的总 RNA。然后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,并使用 NanoDrop 2000 分光光度计 (Thermo Scientific, 美国) 测量浓度。利用 Prime-Script RT reagent KIT (TaKaRa, 日本) 试剂盒将每种鱼类不同组织总 RNA 转录成 cDNA。采用 PRIMER 5.0 根据 CDS 区设计 qRT-PCR 引物 (表 1)。qRT-PCR 反应使用 Light Cycler 480 (Roche, 瑞士),以  $\beta$ -actin 作为内参基因。qRT-PCR 条件为  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 45 s;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  模板变性 15 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 15 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 进行 35 个循环,最后绘制溶解曲线。基因表达定量采用  $\Delta\Delta\text{Ct}$  相对定量法计算。

表 1 RNase 1 基因的引物序列信息

Table 1 Primer sequence of RNase 1 genes

物种 Species	引物名称 Name	引物序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
团头鲂 <i>M. amblycephala</i>	RNase-F	TACTGGTCCTTTGTGCCTTC
	RNase-R	GATTGTGTGATGCGTCTGTG
鳊 <i>H. nobilis</i>	RNase-F	TTATGAGCATTTCCTTACAC
	RNase-R	AACTTGGTTACTATTTGCCT
草鱼 <i>C. idella</i>	RNase-F	GAAATGGATATTCACATAA
	RNase-R	ACTTGGTTACTATTTGCCTG
翘嘴鲌 <i>C. alburnus</i>	RNase-F	CTTTGTGCCTTCTTCTCATT
	RNase-R	TGCCATTTTGGGATTGTGTG

## 2 结果与分析

### 2.1 鲤科鱼类 RNase 1 的同源性和理化性质

经过数据库搜索比对、鉴定与注释,最终获得9种鱼的完整 RNase 1 基因序列。鲤科鱼类基因组中只存在1个 RNase 1 基因。利用 Bio-Edit 软件对9种鱼 RNase 1 序列同源性进行分析比对,结果显示9种鲤科鱼类的 RNase 1 氨基酸序列相似度较

高(图 1A),其中鲢与其他鱼类相似度范围最高(0.686~0.992),鲤与其他鱼类的 RNase 1 氨基酸序列的相似度最低(0.594~0.695)。对 RNase 1 蛋白质的等电点、分子质量等基本物理化学性质分析发现,9种鲤科鱼类 RNase 1 蛋白质序列的物理化学特征非常相似,等电点在 8.85~9.24、分子质量在 14.46~14.90 ku;9种鲤科鱼类带正电的残留总数为 18~21 个(图 1B)。

A

Cc	1.000								
Xd	0.657	1.000							
Hn	0.667	0.940	1.000						
Hm	0.686	0.967	0.973	1.000					
Ci	0.686	0.967	0.958	0.992	1.000				
Ma	0.677	0.953	0.947	0.973	0.975	1.000			
Eb	0.667	0.960	0.953	0.980	0.975	0.967	1.000		
Ca	0.695	0.940	0.933	0.960	0.967	0.960	0.953	1.000	
Dr	0.594	0.728	0.738	0.748	0.748	0.738	0.748	0.718	1.000
物种 Species	Cc	Xd	Hn	Hm	Ci	Ma	Eb	Ca	Dr

B

Items	Cc	Xd	Hn	Hm	Ci	Ma	Eb	Ca	Dr
pI	9.15	9.06	8.85	9.21	8.63	9.24	9.24	8.89	9.22
Mw/ku	14.46	14.66	14.84	14.9	14.73	14.81	14.71	14.67	14.68
K No.	8	2	2	3	1	3	2	1	4
R No.	12	16	17	18	17	17	17	16	15
总数 Total	20	18	19	21	18	20	19	17	19

Cc:鲤 *Cyprinus carpio*; Xd:黄尾鲴 *Xenocypris davidi*; Hn:鳙 *Hypophthalmichthys nobilis*; Hm:鲢 *Hypophthalmichthys molitrix*; Ci:草鱼 *Ctenopharyngodon idella*; Ma:团头鲂 *Megalobrama amblycephala*; Eb:鳊 *Elopichthys bambusa*; Ca:翘嘴鲌 *Culter alburnus*; Dr:斑马鱼 *Danio rerio*; pI:等电点 Isoelectric point; Mw:分子质量 Molecular weight; K No.:赖氨酸的数量 Number of Lys; R No.:精氨酸的数量 Number of Arg; Total:带正电的残留总数(赖氨酸和精氨酸) Total number of positively charged residues (Lys+Arg).

图 1 鲤科鱼类 RNase 1 的氨基酸序列同源性(A)和理化性质(B)

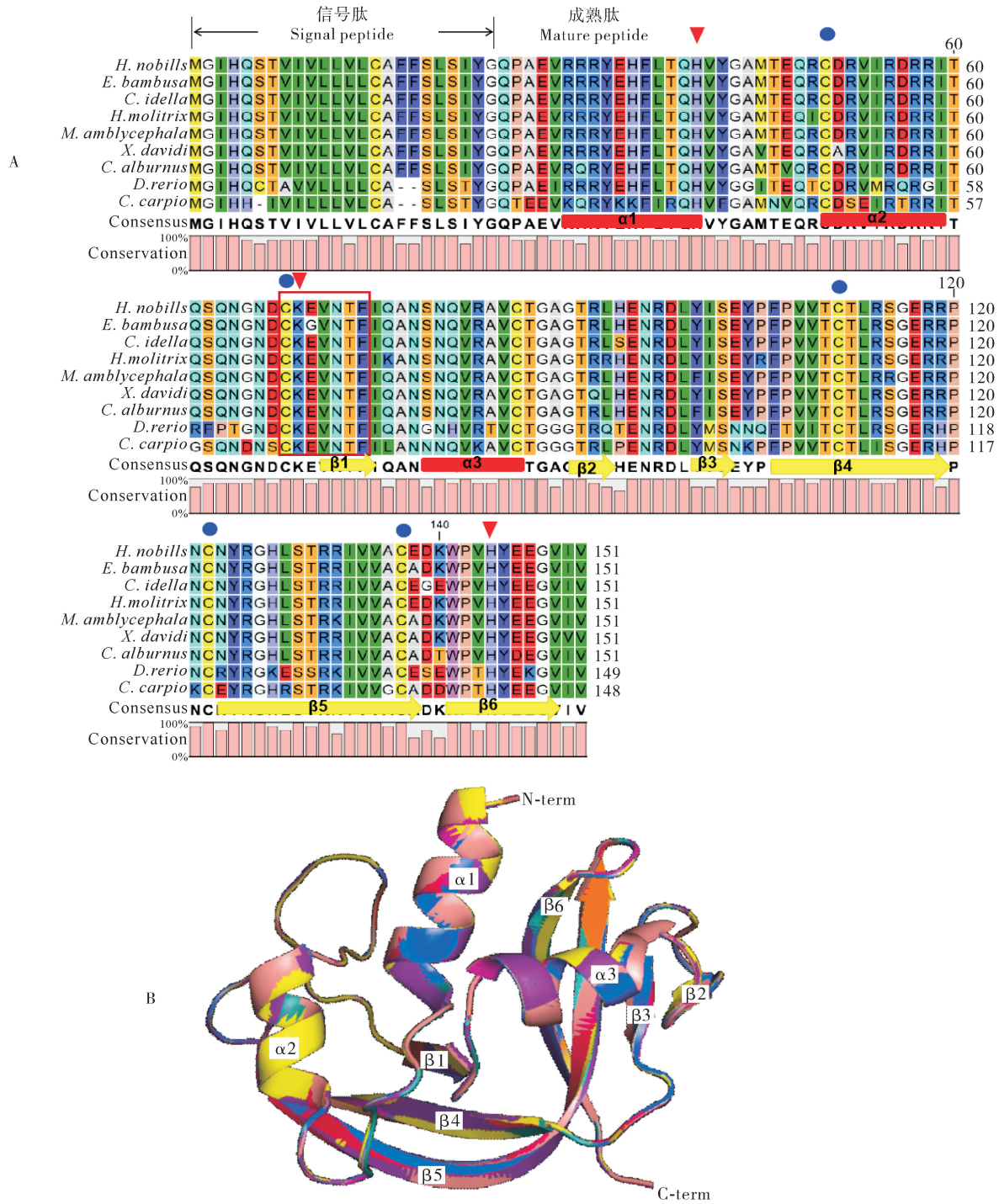
Fig.1 Analyses of the homology (A) and physicochemical properties (B) of RNase 1 in cyprinid fish

### 2.2 鲤科鱼类 RNase 1 氨基酸多序列比对及三级结构预测

多序列比对结果显示,鲤科鱼类的氨基酸数均在 150 个左右,具有 RNase A 超家族的结构特征:N 端有由 20 多个氨基酸组成的信号肽序列、His-Lys-His 催化三联体结构、6 个保守的半胱氨酸残基及“CKXXNTF” motif 序列(图 2A)。利用 Swiss-Model 在线软件对其三级结构进行同源建模,发现这 9 种鲤科鱼类 RNase 1 的三级结构非常相似,均由 3 个  $\alpha$  螺旋、6 个  $\beta$  折叠形成的二级结构和 6 个 Loop 区域组成,保守位点分布在  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠上(图 2B)。

### 2.3 RNase 1 的系统发育分析

为了更好地了解不同脊椎动物 RNase 1 的进化关系,构建哺乳动物和硬骨鱼基于 RNase 1 蛋白质序列系统发育树如图 3、图 4 所示:哺乳动物、啮齿动物及硬骨鱼 RNase 1 明显分为不同的进化支。大多数啮齿动物和陆生哺乳动物的 RNase 1 基因都存在多拷贝,这是基因复制的结果,然而海洋哺乳动物及硬骨鱼的 RNase 1 基因均为单拷贝(图 3A、图 4A)。鲤科鱼类 RNase 1 的 MP 与 ML 进化树显示,团头鲂与翘嘴鲌聚为一支,这与物种进化关系相符;MP 进化树显示鳊与黄尾鲴聚为一支(图 3B、图 4B)。



6 个半胱氨酸(活性位点残基)用蓝色圆圈标记,3 个催化残基用红色三角形显示;3 个  $\alpha$  螺旋( $\alpha$ 1- $\alpha$ 3)和 6 个  $\beta$  转角( $\beta$ 1- $\beta$ 6)分别用红色和黄色表示。The six structural cysteines (active-site residues) are marked with blue circle and three catalytic residues showed with red triangles. Locations of three  $\alpha$ -helices ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 3) and six  $\beta$ -turns ( $\beta$ 1- $\beta$ 6) are shown in red and yellow.

图 2 鲤科鱼类 RNase 1 的氨基酸序列比对(A)及其三维结构(B)

Fig.2 Amino acid sequence alignment of RNase 1 (A) and 3D structure prediction in cyprinid fish (B)



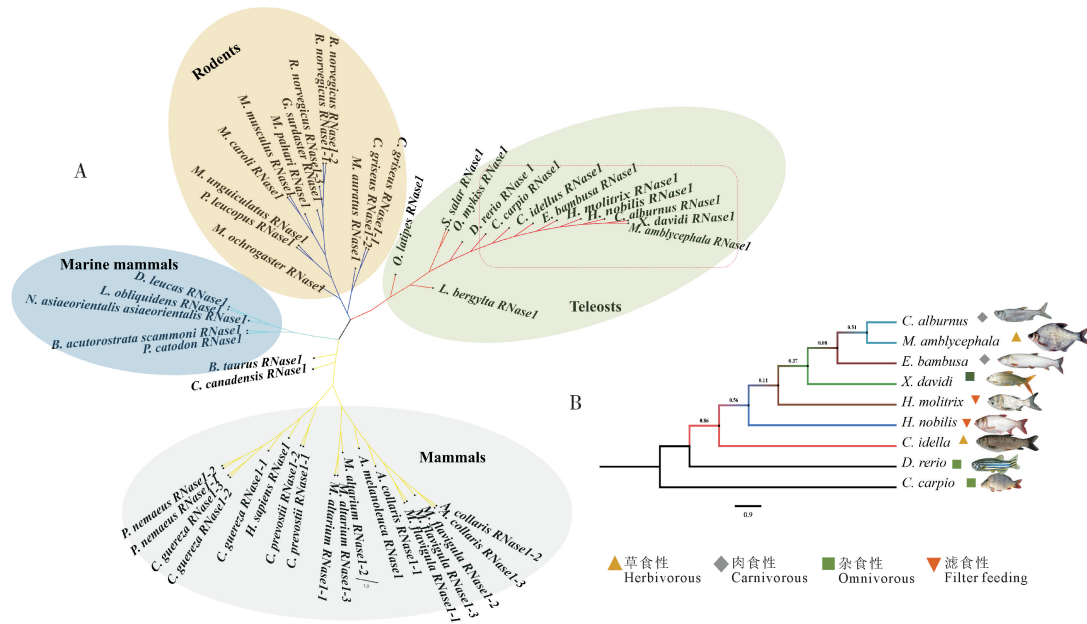


图 3 哺乳动物和鱼类 RNase 1(A)与 9 种鲤科鱼类的 RNase 1(B)的 ML 的系统发育进化树  
Fig.3 ML phylogenetic trees of RNase 1 in mammals and fishes(A) and nine of cyprinid fish(B)

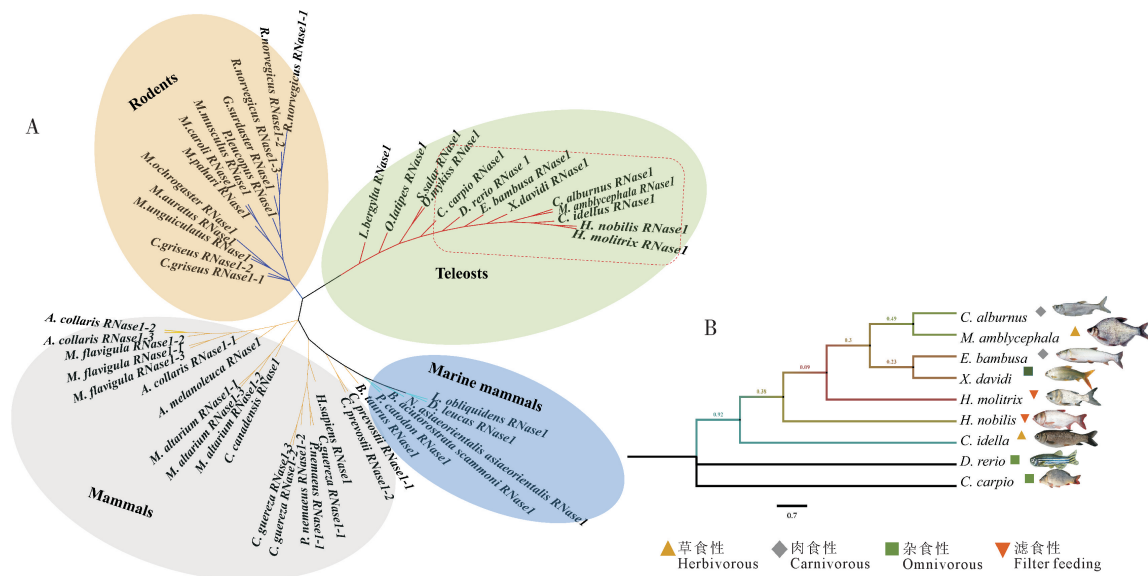
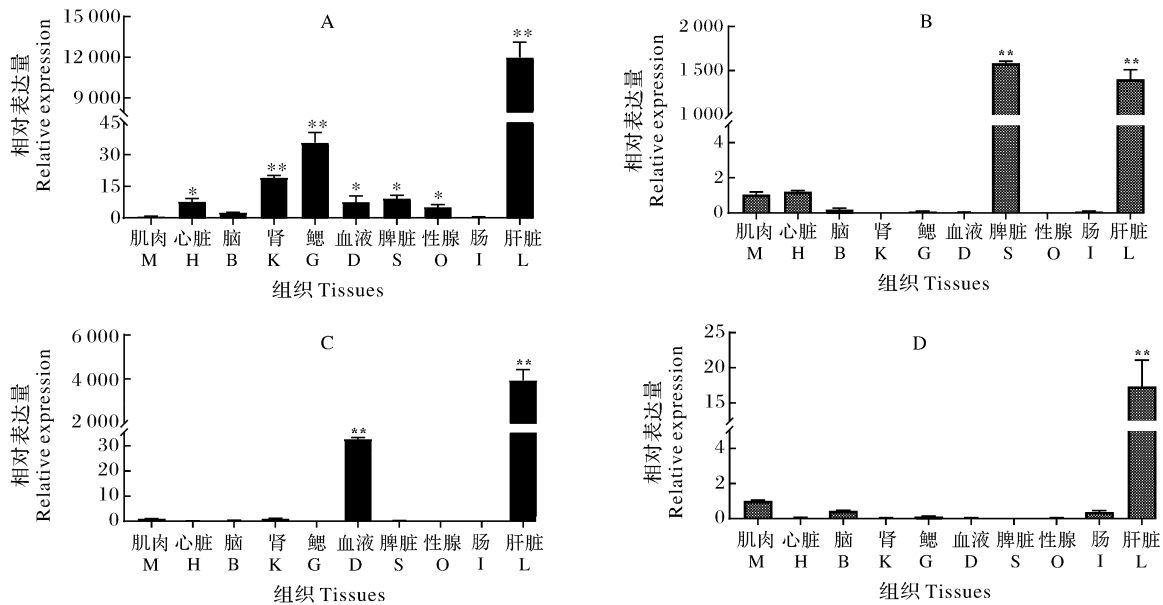


图 4 哺乳动物和鱼类 RNase 1(A)与 9 种鲤科鱼类的 RNase 1(B)的 MP 的系统发育进化树  
Fig.4 MP phylogenetic trees of RNase 1 in mammals and fishes(A) and nine of cyprinid fish(B)

2.4 鲤科鱼 RNase 1 基因的组织表达模式

选取植食性的团头鲂和草鱼、杂食性的鳊和肉食性的翘嘴鲌进行不同食性鱼类 RNase 1 基因在不同组织中的表达模式的研究。qRT-PCR 结果显示(图 5),RNase 1 基因在 4 种鱼不同组织中的表达模式各不相同,其中在肝脏组织中的相对表达量高,差异达到极显著水平( $P < 0.01$ )。除肝脏外,团头鲂 RNase 1 基因在鳃和肾脏中也高表达,差异极

显著( $P < 0.01$ ),在心脏、血液、脾脏和性腺中也有表达(图 5A);翘嘴鲌的 RNase 1 基因只在肝脏和脾脏中高表达( $P < 0.01$ ),其他组织中均不表达(图 5B);在鳊中,RNase 1 基因主要在肝脏和血液中表达,差异极显著( $P < 0.01$ ),在其他组织中均不表达(图 5C)。与团头鲂不同的是,草鱼 RNase 1 只在肝脏中高表达,在其他组织中均不表达(图 5D)。



A: 团头鲂 *M. amblycephala*; B: 翘嘴鲌 *C. alburnus*; C: 鳊 *H. nobilis*; D: 草鱼 *C. Idella*. M: 肌肉 Muscle; H: 心脏 Heart; B: 脑 Brain; K: 肾 Kidney; G: 鳃 Gill; D: 血液 Blood; S: 脾脏 Spleen; O: 性腺 Gonad; I: 肠 Intestine; L: 肝脏 Liver.

图5 4种鲤科鱼类 RNase 1 基因在各组织中的表达模式

Fig.5 The expression patterns of RNase 1 genes in various tissues of four Cyprinidae fishes

### 3 讨论

本研究发现,硬骨鱼与哺乳动物的 RNase 1 分为不同的进化支。在哺乳动物进化支中,大多数 RNase 1 基因存在多个拷贝,特别是在草食性的叶猴和牛身上,然而鱼类进化支上 RNase 1 均为单拷贝基因,没有发生复制,这表明 RNase 1 基因复制是对其消化生理的一种适应<sup>[18]</sup>。鱼类的 RNase 1 基因在基因组中为单拷贝,一方面说明鱼类 RNase 1 进化过程中比较保守,另一方面说明 RNase 1 在低等脊椎动物中适应性分化为特定功能。此外,不同食性鲤科鱼类的 RNase 1 进化显示,相同食性的鱼类并未聚类在一起,从进化角度说明鲤科鱼类的 RNase 1 的进化与物种食性的关联性不大,但符合物种进化的规律。

本研究中,9种不同食性的鲤科鱼类 RNase 1 带正电的氨基酸比例高。研究者们发现在哺乳动物中,具有抗菌作用的 RNase 1 具有较高的等电点<sup>[19-20]</sup>。Cho等<sup>[13]</sup>对斑马鱼 RNase 1 重组蛋白功能的研究发现,RNase 1 蛋白具有较强的消化活性和抗菌功能,斑马鱼的 RNase 1 重组蛋白的等电点不高,但与鸡一样,带正电的氨基酸比例很高。笔者所在实验室前期对团头鲂 RNase 1

重组蛋白的研究也得出同样的结论<sup>[21]</sup>。因此根据进化保守性,推测其在鲤科鱼类中可能普遍具有抗菌功能。

目前对于 RNase 1 的生物学功能假设都集中于消化活性上。我们对 RNase 1 在不同食性鱼类的不同组织中表达模式进行研究,结果显示不同食性的鱼类表达模式存在差异,同种食性鱼类相同组织的表达情况也不同。根据相对定量结果,不同食性鲤科鱼类的 RNase 1 基因在肝脏中的相对表达量均高。以往研究表明鱼类的食性与其自身消化器官的构造及内源性消化酶的消化机能密切相关<sup>[22]</sup>。鱼类肝胰脏分泌内源性消化酶,是鱼类重要的消化腺。而 Cho等<sup>[13]</sup>的研究发现,在斑马鱼的成鱼阶段 RNase 1 基因主要在肝脏和肠道中表达,其重组蛋白 RNase 1 的活性显示出较强的抗菌功能,消化活性不强。在大西洋鲑中曾有报道,RNase 的抗菌功能与消化活性之间没有必然关系,它们互不影响,彼此独立<sup>[23]</sup>。因此,4种鲤科鱼类肝脏中高表达,其他组织中不表达或低表达,可能与斑马鱼一致,主要是在能量代谢方面发挥作用,是否具有消化活性,需要在今后的试验中进行进一步基因功能验证;同种食性的草鱼和团头鲂在其他组织的表达存在显著差异,表明 RNase 1 在同食性的鱼类中可能具有不同

的功能,故从基因表达水平也推测 *RNase 1* 基因进化与其物种本身的食性相关性不大。在翘嘴鲇和团头鲂中,*RNase 1* 基因在脾脏中表达量较高,推测 *RNase 1* 可能与其免疫机能相关。*RNase 1* 基因在鳙血液中高表达,推测其可能参与了系统稳态调节过程,特别是血管稳态的调节。综上所述,*RNase 1* 基因在不同组织中的表达模式各不相同,它们具体行使怎样的生物学功能,还需要在进一步的试验中进行深入探究。

### 参考文献 References

- [1] HARDER J, SCHRÖDER J M. *RNase0 7*, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin[J]. *Journal of biological chemistry*, 2002, 277(48): 46779-46784.
- [2] BARNARD E A. Biological function of pancreatic ribonuclease [J]. *Nature*, 1969, 221(5178): 340-344.
- [3] ROSENBERG H F. Eosinophil-derived neurotoxin / *RNase 2*: connecting the past, the present and the future [J]. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2008, 9(3): 135-140.
- [4] SORRENTINO S, NADDEO M, RUSSO A, et al. Degradation of double-stranded RNA by human pancreatic ribonuclease: crucial role of noncatalytic basic amino acid residues [J]. *Biochemistry*, 2003, 42(34): 10182-10190.
- [5] ZHANG J Z, DYER K D, ROSENBERG H F. *RNase 8*, a novel *RNase A* superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta [J]. *Nucleic acids research*, 2002, 30(5): 1169-1175.
- [6] 徐宏博, 李丹, 赵伟. 人类核糖核酸酶 A 家族 [J]. *生命的化学*, 2012, 32(2): 174-179. XU H B, LI D, ZHAO W. Research progress of human Ribonuclease A superfamily [J]. *Chemistry of life*, 2012, 32(2): 174-179 (in Chinese with English abstract).
- [7] DYER K D, ROSENBERG H F. The *RNase A* superfamily: generation of diversity and innate host defense [J]. *Molecular diversity*, 2006, 10(4): 585-597.
- [8] ZHANG J Z. Parallel adaptive origins of digestive *RNases* in Asian and African leaf monkeys [J]. *Nature genetics*, 2006, 38(7): 819-823.
- [9] YU L, ZHANG Y P. The unusual adaptive expansion of pancreatic ribonuclease gene in Carnivora [J]. *Molecular biology and evolution*, 2006, 23(12): 2326-2335.
- [10] BREUKELMAN H J, JEKEL P A, DUBOIS J Y, et al. Secretory ribonucleases in the primitive ruminant chevrotain (*Tragulus javanicus*) [J]. *European journal of biochemistry*, 2001, 268(14): 3890-3897.
- [11] DUBOIS J Y F, JEKEL P A, MULDER P P M F A, et al. Pancreatic-type ribonuclease 1 gene duplications in rat species [J]. *Journal of molecular evolution*, 2002, 55(5): 522-533.
- [12] DUBOIS J Y F, URSING B M, KOLKMAN J A, et al. Molecular evolution of mammalian ribonucleases 1 [J]. *Molecular phylogenetics and evolution*, 2003, 27(3): 453-463.
- [13] CHO S, ZHANG J Z. Zebrafish ribonucleases are bactericidal: implications for the origin of the vertebrate *RNase A* superfamily [J]. *Molecular biology and evolution*, 2007, 24(5): 1259-1268.
- [14] MJAALAND S, RIMSTAD E, FALK K, et al. Genomic characterization of the virus causing infectious salmon Anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): an orthomyxo-like virus in a teleost [J]. *Journal of virology*, 1997, 71(10): 7681-7686.
- [15] CHEN J, HUANG X, GENG R J, et al. Ribonuclease 1 contributes to the antibacterial response and immune defense in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *International journal of biological macromolecules*, 2021, 172: 309-320.
- [16] GENG R J, JIA Y Y, CHI M L, et al. *RNase 1* alleviates the *Aeromonas hydrophila* induced oxidative stress in blunt snout bream [J]. *Developmental & comparative immunology*, 2019, 91: 8-16.
- [17] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular biology and evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [18] ZHANG J Z, ROSENBERG H F. Complementary advantageous substitutions in the evolution of an antiviral *RNase* of higher Primates [J]. *PNAS*, 2002, 99(8): 5486-5491.
- [19] ZHANG J Z. Parallel functional changes in the digestive *RNases* of ruminants and colobines by divergent amino acid substitutions [J]. *Molecular biology and evolution*, 2003, 20(8): 1310-1317.
- [20] NITTO T, DYER K D, CZAPIGA M, et al. Evolution and function of leukocyte *RNase A* ribonucleases of the avian species, *Gallus gallus* [J]. *Journal of biological chemistry*, 2006, 281(35): 25622-25634.
- [21] LIU H, WANG W M. Expression patterns and functional novelty of ribonuclease 1 in herbivorous *Megalobrama amblycephala* [J]. *International journal of molecular sciences*, 2016, 17(5): 786.
- [22] 刘寒. 基于基因组学的团头鲂植食性机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2016. LIU H. Based on the genomics of *Megalobrama amblycephala* reveals the adaptation to herbivorous diet [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [23] PIZZO E, VARCAMONTI M, MARO A D, et al. Ribonucleases with angiogenic and bactericidal activities from the Atlantic salmon [J]. *FEBS journal*, 2008, 275(6): 1283-1295.

## Evolution and expression patterns of RNase 1 genes in several cyprinid fish species

LIU Ning<sup>1</sup>, CHEN Xiuli<sup>2</sup>, HUANG Xin<sup>1</sup>

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Key Lab of Freshwater Animal Breeding,  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430070, China;

2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Aquatic Science Research Institute, Nanning 530021, China

**Abstract** Pancreatic ribonuclease (RNase 1) is an important digestive enzyme that has been used to study the adaptative evolution of some herbivores to herbivorous diet. Although there have been many functional studies of RNase 1 in mammals, there is little research in fish. In this study, we identified and analyzed the RNase 1 genes from 9 cyprinid fish including herbivorous *Ctenopharyngodon idella* and *Megalobrama amblycephala*, omnivorous *Hypophthalmichthys molitrix*, *Hypophthalmichthys nobilis*, *Cyprinus carpio*, *Xenocypris davidi* and *Danio rerio*, carnivorous *Culter alburnus* and *Elopichthys bambusa*. We also detected the relative expression of the RNase 1 gene in different tissues in 4 fish species with different feeding habits (*M. amblycephala*, *A. nobilis*, *C. alburnus* and *C. idella*). The results showed that there was only one RNase 1 gene in the genomes of the 9 cyprinid fishes, and all the 9 identified fish RNase 1s have the signature motifs of the RNase A superfamily: N-terminal signal peptide, six conserved cysteine residues, the catalytic histidine-lysine-histidine triad and CKXXNTF motif. Phylogenetic analysis indicated that all the fish RNase 1s were clustered together. The RNase 1 genes expressed differently in different tissues of the 4 fish with different feeding habits, mainly expressed in the livers but not in the intestines. These results suggest that the evolution of RNase 1 in Cyprinidae is not related to the food habit of the species, but conforms to the evolutionary law of the species.

**Keywords** RNase 1 gene; cyprinid fish; gene expression; genetic evolution; food adaptability

(责任编辑:边书京)