

黄颡鱼仔稚鱼发育过程中的胰蛋白酶原基因表达

高 超¹ 杨瑞斌¹ 胡文彪¹ 范锦桢²

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 福建省大田县奇韬镇水产站, 大田 366108

摘要 采用 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 方法, 得到黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 消化系统胰蛋白酶原基因 cDNA, 并且对其早期发育过程中仔稚鱼 (1~3 日龄) 消化系统胰蛋白酶原基因表达进行检测和定量。结果表明, 黄颡鱼消化系统中胰蛋白酶原的基因表达起始于 1 日龄, 1~6 日龄表达量快速增加, 6~23 日龄表达量呈起伏式增加, 23~30 日龄表达量显著增加。该结果同时表明使用实时荧光定量 PCR 的方法检测黄颡鱼胰蛋白酶原基因的表达量, 能反映其肠道消化功能在发育过程中的变化。建议黄颡鱼仔稚鱼转饵时间在 23 日龄后。

关键词 黄颡鱼; 仔稚鱼; 胰蛋白酶原; 基因表达; 荧光定量 PCR

中图分类号 Q 959.46 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)02-0227-04

黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 隶属鲶形目 鲿科黄颡鱼属, 因其肉质鲜美而深受人们喜爱。目前全国许多地方已开展黄颡鱼人工养殖。但在黄颡鱼人工繁殖苗种培育过程中, 早期发育的仔稚鱼死亡率很高, 严重制约了黄颡鱼养殖的发展^[1]。为此许多学者从不同角度开展提高黄颡鱼仔稚鱼成活率的研究^[1-3]。胰蛋白酶是消化系统中一类重要的蛋白质消化酶, 在鱼类早期发育蛋白质消化过程中起重要作用^[4]。通过对鱼类消化系统不同发育阶段胰蛋白酶前体物质——胰蛋白酶原基因表达差异性的研究, 可以反映胰蛋白酶 mRNA 的时间表达模式^[5-6], 从分子生物学层面反映早期发育过程中肠道消化功能完善过程^[7-9]。笔者采用实时荧光定量 PCR 的方法, 研究黄颡鱼早期发育过程中消化系统胰蛋白酶原基因表达, 旨在根据不同生长发育阶段胰蛋白酶原基因表达量的差异, 准确反映其肠道消化功能的早期发育过程, 为规模化培育优质苗种投饵策略的制定提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验鱼及其饲养

试验鱼为湖泊野生黄颡鱼亲本经人工繁殖、孵化的鱼苗 (鱼苗出膜当天记为 0 日龄, 0 day post-hatching, 0 dph), 出膜后 1 日龄转入华中农业大学水产实验基地实验缸中饲养。实验缸为 60 cm×40

cm×30 cm 的水族箱, 设置 3 个重复, 每箱约 1 500 尾。试验期间水温为 21~24 ℃, 试验用水为曝气的自来水, 整个试验期间持续增氧, 溶氧量保持在 7~9 mg/L, pH 值为 6.8~7.0, 光照为自然光。3 日龄 (仔鱼开口) 开始投喂浮游生物 (取自武汉市南湖), 主要为轮虫 (包括螺形龟甲轮虫 *Keratella cochlearis* 等) 和枝角类 (微型裸腹溞 *Moina micrura* 等); 从 10 日龄起增投水蚯蚓 (*Limnodrilus hoffmeisteri*)。每日饱食投喂 2 次 (08:00 和 20:00), 投喂前清理污物, 投喂 2 h 后及时清理残饵。

1.2 实时荧光定量 PCR

1) 总 RNA 的提取。于 1~6、8、10、14、18、23、30 日龄上午 08:00 (投喂之前) 从 3 组重复的实验缸中分别取黄颡鱼仔稚鱼消化系统组织 (每组 200 mg) (1~2 日龄取去头尾的仔鱼作为消化系统组织提取总 mRNA)。RNAisoTM Plus (宝生物工程有限公 司) 提取样品总 RNA, 参照说明书操作得到 40 μL (核酸质量浓度约为 1 000~1 200 ng/mL) 总 RNA, 保存 -80 ℃。总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳显示 28 S 和 16 S, 检测 RNA 的完整性, 紫外分光光度计 (NANP DROP 2000c, Thermo) 检测 RNA 的纯度和浓度。

2) 反转录 PCR 及 cDNA 模板的制备。总 RNA 经 RNase Free ddH₂O (天根生化科技有限公司) 稀释 10 倍, 作为 cDNA 第一链合成的模板。反应体

收稿日期: 2011-05-28

基金项目: 广东省科技厅项目 (2010B090500026)

高 超, 硕士研究生, 研究方向: 渔业资源, E-mail: gaochaobio@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 杨瑞斌, 博士, 副教授, 研究方向: 仔稚鱼发育, E-mail: rbyang@mail.hzau.edu.cn

系(10 μL):1 μL 稀释后的总 RNA,2 μL 5 \times Prime-Script RT Master Mix (PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time, 宝生物工程有限公司),7 μL RNase Free ddH₂O(天根生化科技有限公司)。反应条件:37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s 终止反应。cDNA 在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3) 引物设计合成及质粒标准品的制备。根据 GenBank 中已报道黄颡鱼胰蛋白酶原基因序列, Gene ID: AY940114, 运用 Primer Premier 5.0 设计 1 对荧光定量引物, 引物序列如下: 正向引物 Try_F: 5'-CCTTAGAGCCAATCCTTATC-3'; 反向引物 Try_R: 5'-GCCGTACCCATATCCGAG-3', 退火温度 55 $^{\circ}\text{C}$, 引物扩增产物长度为 96 bp, 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。采用绝对荧光定量 PCR 的方法, 标准品为黄颡鱼胰蛋白酶原基因亚克隆的质粒, 制备方法如下: 以合成的 cDNA 为模板, PCR 扩增黄颡鱼胰蛋白酶原部分基因片段。反应体系(50 μL): 1 μL cDNA(核酸含量约为 600 ng), 25 μL Premix Taq(Premix Taq Version 2.0, 宝生物工程有限公司), 2 μL 正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL 反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 20 μL RNase Free ddH₂O(天根生化科技有限公司)。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 扩增产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳, Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0(宝生物工程有限公司)凝胶纯化。产物连接到 pMD 18-T 载体(宝生物工程有限公司), 转化到感受态大肠杆菌(*E. coli*) 细胞 JM 109(宝生物工程有限公司)中, 37 $^{\circ}\text{C}$ SOC 培养基(含有 X-gal, IPTG 及 Amp)中培养 12 h, 筛选阳性克隆。MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0(宝生物工程有限公司)质粒纯化, PCR 扩增检验, 纯化的质粒即为荧光定量 PCR 反应的标准品。标准品经 10 倍逐级稀释, 选择 5 个适合的梯度浓度进行荧光定量 PCR 反应, 经过 Rotor-Gene Q Series 1.7 软件分析, 即得到标准曲线(图 1)。

4) 实时荧光定量 PCR 反应。反应体系(25 μL): 1 μL cDNA(核酸含量约为 600 ng), 12.5 μL SYBR Premix Ex Taq II (2 \times)(宝生物工程有限公司), 1 μL 正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 1 μL 反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 9.5 μL RNase Free ddH₂O(天根生化科技有限公司)。Rotor-Gene Q 2000(QIAGEN) 进行荧光定量 PCR 反应。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性

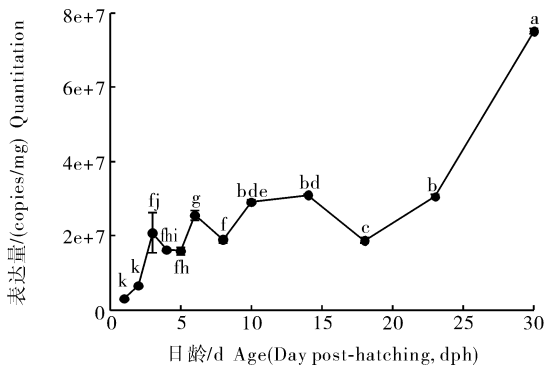
30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 循环 40 次; 预溶解 90 s, 72~95 $^{\circ}\text{C}$ 溶解, 每 5 s 增加 1 $^{\circ}\text{C}$ 。反应包括各日龄样品(3 组重复)、标准曲线(3 个重复)、空白对照、阳性对照和阴性对照。

5) 数据处理。标准曲线由 Rotor-Gene Q Series 1.7 软件分析并输出结果。各日龄样品基因表达量由 Rotor-Gene Q Series 1.7 软件输出, 结果以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)的形式表示。采用 SPSS Statistics 17.0 作图, 并对不同日龄之间基因表达量的差异进行 one-way ANOVA 分析, Duncan's 程序评价其差异显著性($P=0.05$)。

2 结果与分析

采用绝对荧光定量 PCR 的方法, 对黄颡鱼仔稚鱼胰蛋白酶原基因表达进行定量检测, 携带黄颡鱼胰蛋白酶原基因部分片段的质粒经分离纯化, 作为荧光定量 PCR 反应的标准品, 经荧光定量 PCR 反应得到标准曲线——CT 值 = -3.409 \times 基因表达量(copies/ μL) + 36.618 ($R^2=0.99$)。根据荧光定量的标准曲线对黄颡鱼仔稚鱼胰蛋白酶原基因表达进行定量研究, 结果发现: 在 1 日龄胰蛋白酶原基因即有表达; 前 2 日龄基因表达量很少; 3 日龄起基因表达量显著增加($P<0.05$); 4 日龄和 5 日龄相对减少后在 6 日龄又显著增加, 但与 3 日龄无明显差异($P<0.05$)。基因在 8 日龄表达量相对较少, 但是与 3、4 和 5 日龄相比没有显著性差异($P>0.05$)。10 日龄基因表达量逐渐增加但与 6 日龄时无显著差异($P>0.05$); 14 日龄基因表达量继续增加, 显著高于 6 日龄($P<0.05$), 但与 10 日龄无显著差异($P>0.05$); 18 日龄基因表达量明显减少($P<0.05$), 降至 4~5 日龄及 8 日龄水平; 23 日龄基因表达量重新增加, 恢复并超过 10 日龄和 14 日龄水平; 30 日龄基因表达量显著增加($P<0.05$)(图 1)。试验的空白对照没有检测到荧光信号, 阴性对照有极少量荧光信号检出, 阳性对照则检测出荧光信号。

对不同日龄基因表达量进行趋势拟合, 发现黄颡鱼仔稚鱼消化系统发育过程胰蛋白酶原基因表达呈二元三次方程($y = -3.774e6 + 7.421e6x - 5.824e5x^2 + 1.408e4x^3$, $R^2=0.94$)发育趋势, 该曲线反映出黄颡鱼仔稚鱼(1~30 日龄)消化系统胰蛋白酶原基因表达存在 3 个阶段: 1~6 日龄表达量快速增加, 6~23 日龄表达量存在起伏并缓慢增加, 23~30 日龄表达量显著增加。



数值以平均值±标准误的形式表示,不同字母表示差异显著($P<0.05$)。Values express as Mean±SE with the different superscript are significantly different ($P<0.05$).

图1 不同日龄黄颡鱼仔稚鱼消化系统胰蛋白酶原基因表达
Fig. 1 Gene expression of trypsinogen in *P. fulvidraco* larvae from 1 to 30 dph

3 讨论

与消化酶的发育密切相关的消化系统功能的完善是影响鱼类早期发育的重要因素之一。胰蛋白酶是鱼类对蛋白质消化过程中起重要作用的消化酶^[4]。消化酶的活性受到多种因子的调控,而其前体酶原的合成则是受到基因的调控^[10]。荧光定量PCR检测结果显示,黄颡鱼仔鱼胰蛋白酶原基因在1日龄即开始表达,早于开口时间(3日龄)。相似结果在对其他鱼类如罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[7]、赤鲷(*Pagrus pagrus*)^[8]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[9]、翘嘴红鲌(*Culter alburnus*)^[9]等研究中也有报道。本研究表明黄颡鱼消化系统中胰蛋白酶原基因在1日龄开始表达,但是在其早期生活史中胚胎期及刚出膜仔鱼(0日龄)是否有胰蛋白酶原的基因表达有待于进一步深入研究。开口前胰蛋白酶原的基因表达表明出膜后仔鱼消化功能发育迅速,为蛋白质的消化吸收做好准备。

本试验结果表明,在6~23日龄时黄颡鱼仔稚鱼胰蛋白酶原基因表达量存在起伏增长的过程,特别地在18日龄还存在一个明显下降的过程。而对黄颡鱼消化道胰蛋白酶活性的研究表明,胰蛋白酶活性表现为先增加后降低的现象^[5]。在舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[11]和塞内加尔鲷(*Solea senegalensis*)^[12]早期发育胰蛋白酶活性的研究中,同样发现这一现象。Wang等^[6]认为这并不意味着胰蛋白酶的合成量减少,而是生长和发育过程中一系列新的组织和器官生成,导致鱼体蛋白质总量增

加实际检测出来的胰蛋白酶活性降低。根据本试验的结果,笔者则认为基因表达量的下降意味着胰蛋白酶原的合成量下降,表明黄颡鱼仔稚鱼在此阶段存在一个胰蛋白酶合成减少的阶段。黄颡鱼仔稚鱼在发育过程中存在的胰蛋白酶合成量下降的阶段,可能与仔稚鱼各器官发育不同步有关,如欧洲无须鲂(*Merluccius merluccius*)早期发育的特点是头部和躯干部迅速增长而鱼体其他部位生长缓慢,这种生长模式是为了让头部摄食器官口裂发育到能捕食到更多种类的饵料^[13]。

黄颡鱼仔稚鱼胰蛋白酶原基因表达量随日龄的增长呈二元三次方程曲线变化的趋势,表明其消化系统发育也存在阶段性;在出膜后1~6日龄迅速发育,为消化利用外源性饵料做好准备;在6~23日龄蛋白质更多地用于其他组织器官的生长发育,所以胰蛋白酶原基因表达并没有明显增加,但是为了维持正常的消化生理活动,其表达量必须维持在一定水平;23日龄后表达量显著增加,表明仔鱼在将蛋白质用于其他组织器官发育变化后,重新将蛋白质分配到胰蛋白酶原的合成,以利于机体消化功能的进一步完善,以消化更多的饵料来满足进一步生长需要。本研究结果也暗示6~23日龄黄颡鱼仔稚鱼可能处于一个机能变化较剧烈的发育敏感期。

在规模化的苗种培育过程中,饵料转换直接影响仔稚鱼存活、生长和发育,转饵时间的确定被认为是影响仔稚鱼成活率的重要因素之一^[14]。目前对于黄颡鱼转饵时间的确定存在争议,有研究认为最早可在6日龄转饵^[2],但是该研究同样发现在12日龄以前,投喂人工饵料的仔鱼体质量和全长明显小于投喂活饵料的仔鱼^[2]。通过对黄颡鱼早期发育胰蛋白酶原基因表达的研究,笔者认为6~23日龄黄颡鱼仔稚鱼尚处于发育敏感期,消化功能尚不完善,建议转饵时间在23日龄以后。这也与笔者前期通过对黄颡鱼个体发育过程中消化道显微和超微结构的研究所建议的转饵时间相吻合^[1]。

参 考 文 献

- [1] YANG R B, XIE C X, FAN Q X, et al. Ontogeny of the digestive tract in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* larvae[J]. Aquaculture, 2010, 302: 112-123.
- [2] LU S F, ZHAO N, ZHAO A Y, et al. Effect of soybean phospholipid supplementation in formulated microdiets and live food on foregut and liver histological changes of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae[J]. Aquaculture, 2008, 278: 119-127.

- [3] 于艳梅,吴志新,陈孝焯,等. 魔芋甘露对黄颡鱼非特异性免疫功能及生长的影响[J]. 华中农业大学学报,2010,29(3):351-355.
- [4] RYPINEWSKI W, PERRAKIS A, VORGIAS C E, et al. Evolutionary divergence and conservation of trypsin[J]. *Protein Eng*, 1994, 7(1):57-64.
- [5] PERES A, ZAMBONINO-INFANTE J L, CAHU C L, et al. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae[J]. *Fish Physiol Biochem*, 1998, 19:145-152.
- [6] WANG C F, XIE C X, ZHU X M, et al. Effects of age and dietary protein level on digestive enzyme activity and gene expression of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae[J]. *Aquaculture*, 2006, 254:554-562.
- [7] LO M J, WENG C F. Developmental regulation of gastric pepsin and pancreatic serine protease in larvae of the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus* [J]. *Aquaculture*, 2006, 261:1403-1412.
- [8] DARIAS M J, MURRY H M, GALLANT J W, et al. The spatiotemporal expression pattern of trypsinogen and bile salt-activated lipase during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*, Pisces, Sparidae) [J]. *Mar Bio*, 2007, 152:109-118.
- [9] RUAN G L, LI Y, GAO Z X, et al. Molecular characterization of trypsinogens and development of trypsinogen gene expression and tryptic activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and topmouth culter (*Culter alburnus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2010, 155:77-85.
- [10] MOYANO F J, DIAZ M, ALARCON F J, et al. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) [J]. *Fish Physiol Biochem*, 1996, 98:344-353.
- [11] ZAMBONINO-INFANTE J L, CAHU C L. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae[J]. *Fish Physiol Biochem*, 1994, 12:399-408.
- [12] MARTINEZ I, MOYANO F J, FERNANDEZ-DIAZ C, et al. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole *Solea senegalensis* [J]. *Fish Physiol Biochem*, 1999, 21:317-323.
- [13] BJELLAND R M, SKIFTESVIK A B. Larval development in European hake (*Merluccius merluccius* L.) reared in a semi-intensive culture system[J]. *Aquaculture Research*, 2006, 37:1117-1129.
- [14] KESTEMONT P, JOURDAN S, HOUBART M, et al. Size heterogeneity, cannibalism and competition in predatory fish larvae; biotic and abiotic influences [J]. *Aquaculture*, 2002, 227:333-356.

Trypsinogen gene expression of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* larvae and juvenile

GAO Chao¹ YANG Rui-bin¹ HU Wen-biao¹ FAN Jin-hui²

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. The Fishery Technical Service Station of Qitao, Datian 366108, China

Abstract The first-strand cDNA sequence encoding pancreatic trypsinogen (TRY) gene was isolated from yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) larvae (1-30 dph, day post-hatching) by RT-PCR, and using real-time PCR to detected and quantitated the trypsinogen gene expression. The results showed that the onset of trypsinogen gene expression in *P. fulvidraco* larvae was 1 dph and the trypsinogen gene expression increased significantly from 1 to 6 dph, increased fluctuantly from 6 to 23 dph and rose sharply from 23 to 30 dph. The experimental results demonstrated that the detection and quantitation of trypsinogen gene expression in *P. fulvidraco* larvae would accurately reflect the process that digestive functioning developed in intestinal tract. And we suggested that weaning time of *P. fulvidraco* larvae would be much better after 23 dph.

Key words *Pelteobagrus fulvidraco*; larvae; trypsinogen; gene expression; real-time PCR