

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00208

碱性磷酸酶在大菱鲂不同组织的表达及其与甲状腺激素的关系

田娟, 施志仪

上海海洋大学 生物技术研究中心, 上海 201306

摘要: 为了探讨碱性磷酸酶(ALP)基因在大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)体内的表达情况及在细胞水平上三碘甲状腺原氨酸(T₃)对碱性磷酸酶(ALP)基因表达量的影响, 利用荧光定量 PCR 法检测了大菱鲂肠、肌肉、脾脏、心脏、鳃、肝脏、肾脏及脑 8 个不同组织中 ALP mRNA 的表达情况, 并且用 0 nmol/L、50 nmol/L、75 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L 5 个不同浓度的 T₃ 处理大菱鲂肾细胞(SMKC), 采用实时荧光定量 PCR 法测定 T₃ 处理后细胞中 ALP mRNA 的表达情况。结果表明, ALP mRNA 在大菱鲂不同组织中的表达量各不相同, 具有组织特异性。心脏组织中 ALP mRNA 的表达量最高, 其次是肝脏组织和鳃组织中, 肌肉组织中 ALP mRNA 的表达量最少。不同浓度 T₃ 处理后大菱鲂肾细胞后, 细胞中碱性磷酸酶基因的表达量存在明显的差异, ALP mRNA 的表达量随着 T₃ 浓度的增加有递增趋势。结论认为, ALP 基因在大菱鲂成鱼 8 个不同组织中均有表达, 但其表达量却有明显的差异, 具有组织特异性。ALP 基因的表达量受甲状腺激素 T₃ 正向调控, 并有浓度依赖性。[中国水产科学, 2011, 18(1): 208–213]

关键词: 大菱鲂; 碱性磷酸酶 (ALP); 甲状腺激素(T₃); 大菱鲂肾细胞(SMKC); 实时荧光定量 PCR
中图分类号: S917; Q291 文献标识码: A 文章编号: 1005-8737-(2011)01-0208-06

碱性磷酸酶(ALP)是 1 个同型二聚体的磷酸单酯酶, 是包含锌离子和镁离子的金属酶, 它能在碱性条件下水解单磷酸酯^[1-2]。碱性磷酸酶在生物界分布广泛, 有众多催化底物和复杂的生理功能^[3-4]。除了在少数植物中外, 碱性磷酸酶广泛分布于大多数生物体内, 在大肠杆菌中, 它分布在细胞周质^[5], 而在哺乳动物中它通过磷脂酰多糖侧链结合在细胞膜上^[6-7]。ALP 不仅直接参与机体内物质的代谢和运输, 而且还与蛋白质的合成和分泌有关^[8]。它对于生物钙质的吸收、骨骼的钙化、胚胎的发育、营养的吸收、甲壳素的分泌及形成具有重要作用, 是水生动物赖以生长、生存的重要酶类之一^[9-11]。

在哺乳动物体内, 多种激素对碱性磷酸酶的表达均有影响, 特别是甲状腺激素。目前已经确

认人肠特异性碱性磷酸酶(IAP)是甲状腺激素受体的下游靶基因, 甲状腺激素对 ALP 基因的表达具有调控作用^[12]。实验证明人甲状腺激素受体能结合于肠碱性磷酸酶基因的启动子区, 直接参与碱性磷酸酶的转录调节。水生动物 ALP 的研究较多地集中于组织学、酶的生化性质等方面, 关于基因表达和调控的报道还不多。在鱼类中斑马鱼(*Danio rerio*)、河鲀(*Fugu rubripes*)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的碱性磷酸酶基因已被克隆。陈晓武等^[13]在研究中发现, ALP 在牙鲆仔鱼变态发育过程中具有一定的生理作用, 特别是对骨骼细胞形态和消化功能的影响尤为显著。施志仪等^[14]克隆出 1 段牙鲆 ALP 基因 5' 调控区序列, 并对其活性进行了初步研究, 表明这段序列能够指导外源性的增强型绿

收稿日期: 2010-01-28; 修订日期: 2010-03-15.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30271017); 国家教育部博士项目基金(20040264001).

作者简介: 田娟(1984-), 硕士, 研究方向为鱼类发育生物学. E-mail: tian_hjuan@163.com

通讯作者: 施志仪(1954-), 教授. Tel: 021-61900051; E-mail: zyshi@shou.edu.cn

色荧光蛋白在 COS-7 细胞中表达。但迄今为止, 关于甲状腺激素与碱性磷酸酶关系的深入研究尚未在鲆鲽鱼类中进行。

大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 属于鲽形目 (Pleuronectiformes) 鲆科 (Bothidae) 菱鲆属, 主要产于大西洋东侧沿岸, 是名贵的低温经济鱼类。大菱鲆在早期阶段与牙鲆有相同的右眼移位变态发育的过程, 从生物进化树角度分析, 也与牙鲆的亲缘关系较近。本实验主要对碱性磷酸酶在大菱鲆各组织中的分布、表达以及大菱鲆肾细胞 (SMKC) 中三碘甲状腺原氨酸与碱性磷酸酶基因的关系进行研究, 以期为进一步探索碱性磷酸酶和甲状腺激素的关系, 为阐明鲆鲽鱼类变态发育的调控机理提供资料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验用大菱鲆成鱼购于上海铜川路水产市场, 在实验室暂养。大菱鲆肾细胞 (SMKC) 由中国水产科学研究院黄海水产研究所陈松林老师惠赠。DMEM 培养基粉末、胎牛血清、Hepes、成纤维细胞生长因子 (bFGF) 购于 Invitrogen; 三碘甲状腺原氨酸 (T3) 购于 Sigma 公司; TRIzol、RNasin Ribonuclease Inhibitor、SYBR Premix Ex Taq 购于 TAKARA 公司; M-MLV 逆转录酶购于 Promage 公司。

1.2 方法

1.2.1 大菱鲆各组织总 RNA 的提取与 cDNA 的合成 用手术剪准确剪取大菱鲆肠、肌肉、脾脏、心脏、鳃、肝脏、肾脏及脑 8 个不同组织, 生理盐水洗净后用 TRIzol 试剂法提取 8 个组织的总 RNA, 分光光度计检测其 OD 值, 1.0% 琼脂糖凝

胶电泳检测 RNA 的完整性, 按 Promage 逆转录酶说明书反转录合成 cDNA。

1.2.2 细胞培养及药物处理 SMKC 用 DMEM 培养基培养, 培养基中含 15% 胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μ g/mL、bFGF 2 ng/mL、Hepes 20 mmol/L, 置于 24 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。细胞长满整瓶后用 0.25% 胰酶消化传入六孔板中, 待细胞长满孔板更换新鲜培养基, 同时加入甲状腺激素 T3 溶液作用 12 h, 参考 Malo 等^[12]对 Caco-2 人结肠腺癌细胞的实验, 设计了 T3 溶液的处理浓度分别为 0 nmol/L、50 nmol/L、75 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L, 以处理浓度为 0 nmol/L 组为对照, 每个浓度设 3 个重复。

1.2.3 大菱鲆肾细胞 (SMKC) 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成 PBS 溶液冲洗细胞 2 次后用 TRIzol 法提取细胞的总 RNA, 分光光度计检测其 OD 值, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 按 Promage 逆转录酶说明书反转录合成 cDNA。

1.2.4 引物设计 参照 GenBank 中大菱鲆 ALP (DQ848861) 和 β -actin (AY008305) 的相关序列, 分别设计了各基因的特异性引物 (表 1)。

1.2.5 常规 PCR 扩增 PCR 反应体系为: 10 \times PCR Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L、dNTP 2 μ L、10 μ mol/l 上下游引物各 0.5 μ L、5 U/ μ L 的 *Taq* DNA 酶 0.2 μ L、反转录产物 0.5 μ L, 补充 ddH₂O 至 25 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。扩增产物回收纯化后测序检测。

1.2.6 实时荧光定量 PCR

(1) 标准曲线的建立 样品 cDNA 进行 10 倍系列稀释, 以稀释后的 cDNA 为模板进行实时荧

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物
Tab.1 Primers used for real-time quantitative PCR analysis

引物 primer	序列 sequence
ALP-F	5'-ATCGATTACCAGGAAAAACAACCTACC-3'
ALP-R	5'-CGTCCCGCCAAATGACATAC-3'
β -actin-F	5'-GGAAATCGTGCGTGACATTAAG-3'
β -actin-R	5'-CCTCTGGACAACGGAACCTCT-3'

光定量PCR, 每个模板重复 2 次。反应体系为: SYBR Premix Ex Taq(2×)10 μL、10 μmol/L上下游引物各 0.4 μL、cDNA模板 2 μL, 加ddH₂O至 20 μL。反应条件为: 95℃预变性 1 min; 95℃变性 10 s、60℃退火 30 s、72℃延伸 30 s, 共 40 个循环。融解曲线制备: 55~90℃, 每 0.5℃收集 1 次荧光信号, 共 71 个循环。

(2) 目的基因的定量 对样品 cDNA 进行目的基因实时荧光定量 PCR 扩增, 反应体系及反应条件同标准曲线建立部分, 每个样品重复 3 次。

1.2.7 数据分析 根据实时荧光定量PCR结果, 以β-actin为参照基因, 根据目的基因及β-actin的C_t值, 按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的表达情况。运用SPSS统计软件进行多重比较分析差异显著性, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 大菱鲂各个组织和肾细胞中碱性磷酸酶基因的表达

常规 PCR 扩增检测大菱鲂肠、肌肉、脾脏、心脏、鳃、肝脏、肾脏及脑 8 个不同组织及肾细胞中的碱性磷酸酶的表达情况, 从扩增结果看出, 肠、肌肉、脾脏、心脏、鳃、肝脏、肾脏及脑 8 个不同组织及大菱鲂肾细胞中均检测到有碱性磷酸酶基因表达(图 1)。

对大菱鲂肠、肌肉、脾脏、心脏、鳃、肝脏、肾脏及脑 8 个不同组织的cDNA进行荧光定量PCR扩增, 根据实时荧光定量PCR结果, 以β-actin为参照基因, 根据目的基因及β-actin的C_t值, 按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算碱性磷酸酶(ALP)在大菱鲂 8 个组织中的表达情况。从图 2 结果看出, 碱性磷酸酶在大菱鲂各组织中的表达量有明显的差异, 心脏组织中碱性磷酸酶的表达量最高; 其次是肝脏组织和鳃组织中; 脾脏、肾脏、脑和肠中碱性磷酸酶的表达量较少; 肌肉组织中碱性磷酸酶的表达量最少。

2.2 T₃处理对大菱鲂肾细胞ALP mRNA表达量的影响

T₃ 处理后, 大菱鲂肾细胞 ALP mRNA 表达

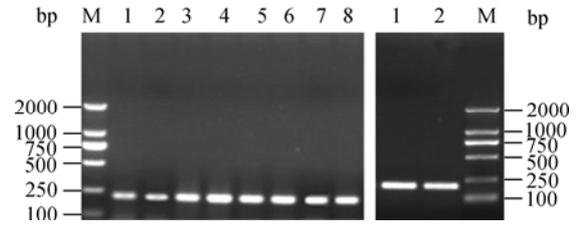


图 1 大菱鲂各个组织与肾细胞中碱性磷酸酶基因的表达情况

A: 组织中 ALP 表达情况。M. marker, 1. 肠, 2. 肌肉, 3. 脾脏, 4. 心脏, 5. 鳃, 6. 肝脏, 7. 肾脏, 8. 脑。

B: 肾细胞中 ALP 表达情况。1、2 为 ALP mRNA 在 SMKC 中的表达; M. marker。

Fig. 1 Expression of alkaline phosphatase gene in different tissues and SMKC of *Scophthalmus maximus*

A: The expression of alkaline phosphatase gene in different tissues. M. marker; 1.intestine; 2. muscle; 3. spleen; 4. heart; 5. gill; 6. liver; 7. kidney; 8. brain.

B: The expression of alkaline phosphatase gene in *Scophthalmus maximus* kidney cell. 1-2. expression of alkaline phosphatase gene in SMKC; M.marker.

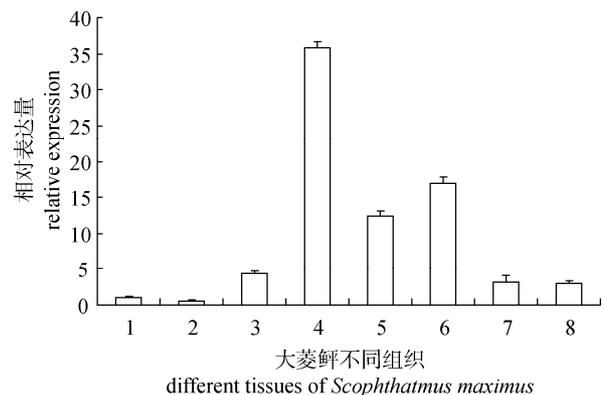


图 2 ALP mRNA 在大菱鲂不同组织中表达

1 为肠; 2 为肌肉; 3 为脾脏; 4 为心脏; 5 为鳃; 6 为肝脏; 7 为肾脏; 8 为脑。

Fig. 2 Expression of ALP mRNA in different tissues of *Scophthalmus maximus*

1. intestine; 2. muscle; 3. spleen; 4. heart; 5. gill; 6. liver; 7. kidney; 8. brain.

量较对照组均明显升高。ALP mRNA 的表达量随着 T₃ 浓度的增加而递增, T₃ 浓度为 50 nmol/L 时, ALP mRNA 表达量达到了对照组的 1.4 倍($P < 0.05$); T₃ 浓度为 75 nmol/L 时, ALP mRNA 表达量达到了对照组的 2.4 倍($P < 0.05$); 而 T₃ 浓度为 100 nmol/L 时, ALP mRNA 表达量达到了对照组的 2.9 倍($P < 0.05$); 在 T₃ 浓度 200 nmol/L 时, 表达量达到了对照组的 3 倍($P < 0.05$)(图 3)。多重比较分析

表明, 各浓度 T3 处理组与正常组相比差异均显著, 但相邻两浓度处理组之间的差异不显著, T3 处理浓度为 100 nmol/L 和 200 nmol/L 时与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。

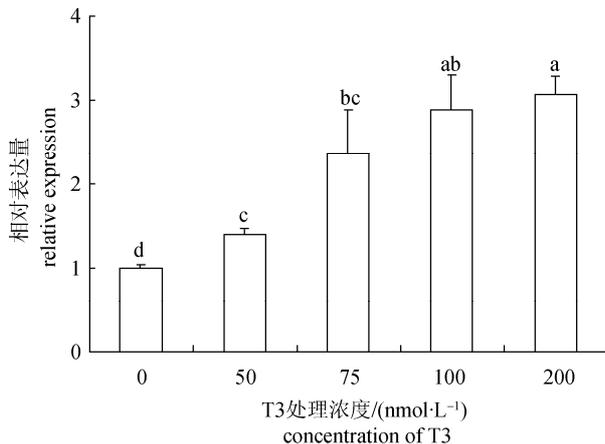


图 3 大菱鲂肾细胞中 ALP 的相对表达量
标注不同字母的各项间差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 3 Relative expression of ALP mRNA in *Scophthalmus maximus* kidney cells
Different letters donate significant difference between different treatments ($P < 0.05$).

3 讨论

碱性磷酸酶是一种广泛分布的单脂磷酸水解酶, 它本身是 1 种膜结合金属糖蛋白, 由 2 个亚单位组成, 其同工酶种类很多, 以人和小鼠为例, 都具有 1 种组织非特异性 ALP (Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase, TSNALP) 在肝、肾、骨骼、早期胚胎等组织中表达^[14]。另外人和小鼠还分别有 3 种和 2 种组织特异性 ALP (Tissue-Specific Alkaline Phosphatase, TSALP), 包括人的肠 ALP^[15]、胎盘 ALP^[14] 和生殖细胞 ALP^[16], 以及小鼠的肠 ALP^[17] 和胚胎 ALP^[18]。很多研究表明, 胎盘型 ALP、生殖细胞型 ALP 和小肠型 ALP 的基因具有高度的同源性, 98% 的氨基酸序列是相同的^[14-16]。陈晓武等^[19]克隆了牙鲆 ALP 基因 cDNA 全序列, 并对其进行分析。RT-PCR 显示 ALP mRNA 在牙鲆体内广泛分布于肝、肾、皮肤、皮下肌肉和胃肠内表层等组织^[13], 从其 mRNA 的组织表达特点来看, 认为是组织非特异性 ALP。

3.1 ALP mRNA 表达量的组织特异性

在脊椎动物早期发育中, ALP 的表达具有时间和组织特异性^[20-21]。从大菱鲂 8 个组织中 ALP 的表达情况看来, 在大菱鲂成鱼中, ALP mRNA 的分布比较广泛, 但是在各个组织中的表达量有明显的差异, 心脏组织中的 ALP mRNA 表达量最高, 其 ALP mRNA 的表达量是肠组织中的 35.7 倍; 其次是肝脏, 其 ALP mRNA 的表达量是肠组织中的 16.9 倍; 鳃组织中的表达量是肠组织中的 12.4 倍; 脾脏组织中的表达量是肠组织中的 4.4 倍; 肾脏和脑组织中的表达量是肠组织中的 3 倍; 肌肉组织表达量最少, 仅是肠组织中 ALP mRNA 表达量的 0.6 倍。由此可见, 在大菱鲂成鱼中 ALP 的表达具有组织特异性。

3.2 甲状腺激素正向调控 ALP mRNA 的表达

甲状腺激素对于动物的生长发育、神经系统的形成、营养的吸收和代谢等具有重要作用。目前已经确认甲状腺激素在牙鲆变态发育中具有重要作用^[22-23], 而甲状腺激素是通过其受体介导从而发挥生物学作用。甲状腺激素进入细胞核后与受体结合, 激活受体, 并使之结合于基因的一段特定的 DNA 序列, 即甲状腺应答因子 (responsive element), 从而正向或反向调节特定基因的转录和表达^[24-25]。对人和老鼠中的研究表明, 碱性磷酸酶是甲状腺激素受体下游的靶基因。哺乳动物细胞中关于 ALP 基因调控转录的分子机制已有不少报道, 研究表明, 在小鼠成骨细胞中三碘甲状腺原氨酸 T3 可以刺激 ALP 的释放, 增强其活性^[26]。Malo 等^[12]用 100 nmol/L 的 T3 作用于 Caco-2 人结肠腺癌细胞 0 h、6 h、12 h、24 h, Northern blots 检测发现, 随着 T3 处理时间的延长, ALP 基因的表达量随之增加。通过启动子片段缺失分析表明人 IAP 基因启动子存在 1 个甲状腺激素应答元件 (Thyroid Hormone Response Element, TRE), EMSA 表明只有 TR 和 TRα1-retinoid X receptor α (RXRα) 形成异源二聚体复合物才能有效结合在人 IAP 的甲状腺激素应答元件上。

从本实验的结果来看, 随着 T3 浓度的增加, 大菱鲂肾细胞中 ALP mRNA 的表达量随之增加,

在T3浓度为200 nmol/L时,表达量达到了对照组的3倍,表明ALP基因的表达量受甲状腺激素T3正向调控,并有浓度依赖性。这与Malo等^[12]的结果相似,说明在海水鱼类细胞中,甲状腺激素对ALP基因的表达存在直接或间接的调控关系,并且正向调控ALP mRNA的表达。

综上所述,碱性磷酸酶基因在大菱鲆成鱼8个不同组织中均有表达,但其表达量却有明显的差异,具有组织特异性。在细胞水平的研究表明三碘甲状腺原氨酸(T3)对碱性磷酸酶有一定的调控作用,ALP的表达量受T3的正向调控,其中具体的调控分子机制有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 耿芳宋,修波,王秀丽,等.小牛肠碱性磷酸酶激活与抑制的动力学观察[J].青岛医学院学报,1995,31(3):191-194.
- [2] 陈清西,陈素丽,石艳,等.长毛对虾碱性磷酸酶性质[J].厦门大学学报:自然科学版,1996,35(2):257-261.
- [3] McComb R B, Bowers G N, Posen S. Alkaline Phosphatase[M]. New York: Plenum Press, 1979.
- [4] Coleman J E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase[J]. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1992, 21: 441-483.
- [5] Inouye H, Barnes E, Beckwith J. Signal sequences of alkaline phosphatase of *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 1982, 149: 434-439.
- [6] Low M G, Saltiel A R. Structural and functional roles of glycosylphosphatidylinositol in membranes [J]. Science, 1988, 239: 268-275.
- [7] Micanovic R, Bailey C A, Brink L, et al. Aspartic acid-484 of nascent placental alkaline phosphatase condenses with a phosphatidylinositol glycan to become the carboxyl terminus of the mature enzyme [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 1398-1402.
- [8] de Backer M, McSweeney S, Hanne B, et al. The 1.9A crystal structure of heat-labile shrimp alkaline phosphatase [J]. Mol Biol, 2002, 318: 1265-1274.
- [9] Izquierdo L, Lopez T. Cell membrane regions in preimplantation mouse embryos [J]. Embryol Exp Morph, 1980(59): 89-102.
- [10] 王石莹,闫素梅.碱性磷酸酶在动物骨骼代谢中的研究进展[J].饲料博览,2009(4):14-16.
- [11] 陈慕雁,张秀梅,连建华.大菱鲆仔稚鱼期消化酶及碱性磷酸酶活性的变化[J].中国海洋大学学报,2005,35(3):483-486.
- [12] Malo M S, Zhang W, Alkhoury F. Thyroid hormone positively regulates the enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase gene via an atypical response element[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(8): 1941-1962.
- [13] 陈晓武,施志仪,顾一峰.牙鲆发育中ALP基因表达图式及功能分析[J].中国海洋大学学报,2007,37(6):894-898.
- [14] 施志仪,顾一峰,陈晓武,等.牙鲆碱性磷酸酶基因5'调控区的克隆及其功能检测[J].生物技术通报,2008,2:207-213.
- [15] Millan J L. Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase [J]. J Biol Chem, 1986, 261(7): 3112-3115.
- [16] Berger J, Garattini E, Hua J C, et al. Cloning and sequencing of human intestinal alkaline phosphatase cDN A [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 695-698.
- [17] Millan J L, Manes T. Seminoma-derived Nagao isozyme is encoded by a germ-cell alkaline phosphatase gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 3024-3028.
- [18] Xie Q, Alpers D H. The two isozymes of rat intestinal alkaline phosphatase are products of two distinct genes [J]. Physiol Genom, 2000, 3(1): 1-8.
- [19] Narisawa S, Hoffman M C, Ziomek C H, et al. Embryonic alkaline phosphatase is expressed at M-phase in the spermatogenic lineage of the mouse[J]. Development, 1992, 116: 159-165.
- [20] 陈晓武,施志仪.牙鲆碱性磷酸酶cDNA序列分析与蛋白质高级结构预测[J].中国生物化学与分子生物学报,2007,23(6):442-449.
- [21] Izquierdo L, Lopez T. Cell membrane regions in preimplantation mouse embryos [J]. Embryol Exp Morph, 1980, 59: 89-102.
- [22] 张红卫,李艳,毛炳宇.文昌鱼早期发育中两种碱性磷酸酶的表达[J].山东大学学报:自然科学版,2001,36(3):336-340.
- [23] De Jesus E G, Hirano T, Inui Y. Flounder metamorphosis: Its regulation by various hormone[J]. Fish Physiol Biochem, 1993, 11(1-6): 323-328.
- [24] Inui Y, Miwa S, Yamano T. Hormonal control of flounder metamorphosis[M]// Perspectives in comparative endocrinology. Ottawa:National Research Council, 1994: 408-411.

- [25] Glass C K, Franco R, Weinberger C, et al. A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone [J]. *Nature*, 1987, 329: 738–741.
- [26] Chatterjee V K K, Lee J K, Rentoumis A, et al. Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone α gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TAT box [J]. *Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 9114–9118.
- [27] Fratzl-Zelman N, Hörandner H, Luegmayr E, et al. Effects of Triiodothyronine on the Morphology of cells and matrix, the localization of alkaline phosphatase, and the frequency of apoptosis in long-term cultures of MC3T3-E1 cells [J]. *Bone*, 1997, 20(3): 225–236.

Expression of alkaline phosphatase (*ALP*) gene in tissues of *Scophthalmus maximus* and relationship between thyroid hormone and alkaline phosphatase

TIAN Juan, SHI Zhiyi

Biotechnology Research Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: It had been proved that the change of ALP activity had obvious effect on the morphology of osteocyte and digestive function in the metamorphosis stage of Japanese flounder (*Scophthalmus maximus*) larvae. In order to study the expression of alkaline phosphatase (*ALP*) gene and the effects of triiodothyronine (T3) on the expression of *ALP* gene in *S. maximus*, real-time fluorescent quantitative PCR was applied to detect the expression of *ALP* mRNA in eight different tissues which were intestine, muscle, spleen, heart, gill, liver, kidney, brain and the *S. maximus*' kidney cell(SMKC) treated by T3 in five different concentrations (0 nmol/L, 50 nmol/L, 75 nmol/L, 100 nmol/L, 200 nmol/L). The results showed that the expression of *ALP* mRNA were various in different tissues, and was tissue-specific. The expression of *ALP* mRNA was the highest in heart, followed by liver and gill, and the lowest was in muscle. There was significant difference on expression of alkaline phosphatase (*ALP*) gene in SMKC after treated by different concentrations of T3. From the results, it can be concluded that *ALP* gene was expressed in eight different tissues, but there was significant difference in expression level, with tissue-specific characters. The expression of *ALP* mRNA had an incremental trend with the increase of T3. It was indicated that expression of *ALP* gene was positively regulated by T3, and was concentration-dependent. [*Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(1): 208–213]

Key words: *Scophthalmus maximus*; triiodothyronine (T3); alkaline phosphatase (ALP); SMKC; real-time fluorescence quantitative PCR

Corresponding author: SHI Zhiyi. E-mail: zyshi@shou.edu.cn