

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19202

胰 α -淀粉酶基因 5'端调控序列与鱼类食性的关系

朱书礼, 张迎秋, 陈蔚涛, 杨计平, 李捷, 武智, 李新辉

中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380

摘要: 为了研究不同鱼类胰 α -淀粉酶基因 5'端调控序列转录因子差异与鱼类食性分化之间的关系。通过 PCR 克隆测序和查询 NCBI 数据库, 获得 32 种鱼类胰 α -淀粉酶基因 5'端 824 bp 序列, 并对鱼类胰 α -淀粉酶基因 5'端序列进行转录因子和系统发育分析。按不同的营养类型将鱼类分为杂食性、植食性和肉食性, 通过百分比相似性分析不同食性鱼类的胰 α -淀粉酶基因转录因子的组成差异以及转录因子与鱼类食性的关系。结果显示: 不同食性鱼类的胰 α -淀粉酶基因 5'端序列存在转录因子种类差异, 植食性-肉食性鱼类差异主要体现在 E47、C/EBPalpha、NF-Y 和 Pax-2, 植食性-杂食性差异主要体现在 deltaEF1、MyoD、NF-Y、AREB6 和 Pax-2, 杂食性-肉食性差异主要体现在 GATA-1、SRY、MyoD、HFH-8、AREB6、Pax-2、STAT5A 和 AP-1。系统发育结果与传统形态分类学大体相符, 相同食性的鱼类并没有聚为一类。鱼类胰 α -淀粉酶基因 5'端调控序列中与食性分化相关的转录因子有 E47、C/EBPalpha、NF-Y、Pax-2、deltaEF1、MyoD、AREB6、GATA-1、SRY、HFH-8、STAT5A 和 AP-1; 胰 α -淀粉酶基因 5'端序列的转录因子与鱼类食性分化具有一定的关系。

关键词: 食性; 鱼类; 淀粉酶基因; 5'端序列

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)03-0277-09

淀粉是生物能量的来源之一, 淀粉酶是参与淀粉和糖原水解的酶类。淀粉酶广泛存在动物、植物以及微生物中。在哺乳动物体内, 主要存在唾液淀粉酶和胰淀粉酶^[1-2]。由于鱼类无唾液腺, 所以鱼类的淀粉酶主要是由肝胰脏分泌的胰淀粉酶^[3]。胰淀粉酶作为重要的消化酶, 对鱼类的消化能力具有重要的作用。目前关于鱼类淀粉酶与食性关系的研究已有较多的报道, 倪寿文等^[4]研究了 5 种鱼肝胰脏淀粉酶活性, 结果显示草食性鱼类淀粉酶活性大于杂食性。Agrawal 等^[5]比较了肉食性、杂食性和草食性鱼类的淀粉酶活性, 结果显示草食性鱼类具有较强的淀粉酶活性, 肉食性鱼类的最弱。Hidalgo 等^[6]研究发现鳗鲡(*Anguilla japonica*)的淀粉酶活性比虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的高, 草食性和杂食性鱼类的淀粉酶活性要高于肉食性鱼类。

陈春娜^[7]克隆了胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*) α -淀粉酶的 cDNA 序列, 并研究了 α -淀粉酶在胭脂鱼体内不同组织中的表达情况。秦帮勇等^[8]对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) α -淀粉酶基因进行了克隆, 并研究了饲料添加剂对 α -淀粉酶基因表达量的影响。结构基因 5'端调控区序列包含启动子和转录因子结合位点等重要调控元件, 在基因表达调控过程中起着非常重要的作用。转录因子(TFs)是参与基因表达转录调控的序列特异性 DNA 结合蛋白, 基因表达通常受多种转录因子(TFs)调控; 转录因子结合的 DNA 区域被定义为转录因子结合位点(TFBSs)^[9]。已有的研究证明, α -淀粉酶基因 mRNA 的表达水平与酶活性具有相关性, α -淀粉酶基因受转录调控^[10]。然而, 目前关于鱼类 α -淀粉酶基因 5'端调控区序列的研究报道还较少。Ma 等^[11]发现在鱼类胰 α -淀粉酶基因

收稿日期: 2019-07-25; 修订日期: 2019-09-20.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0900902); 广西自然科学基金重大项目(2013GXNSFEA053003).

作者简介: 朱书礼(1987-), 男, 硕士, 研究方向为渔业资源和分子生物学. E-mail: zshuli2009@126.com

通信作者: 李新辉, 研究员. E-mail: lxhui01@aliyun.com

启动子区域存在糖皮质激素应答元件(GR),在糖皮质激素的刺激下促进淀粉酶基因的表达。在鳊(*Siniperca chuatsi*) α -淀粉酶基因 5'端调控区中也发现多个对其表达具有调控作用的调控元件^[12]。

淀粉酶与鱼类食性之间有着密切的相关性,以鱼类胰 α -淀粉酶基因 5'端调控序列为研究对象,分析不同食性鱼类的胰 α -淀粉酶基因转录因子种类的差异,筛选出与鱼类食性分化相关的潜在转录因子。本研究以期鱼类食性分化分子机理研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 胰 α -淀粉酶基因 5'端调控序列的获取

获取 32 种不同食性鱼类的胰 α -淀粉酶基因 5'端调控序列。其中 5 种鱼类包括草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鳊(*Aristichthys nobilis*)、青鱼(*Mylropharyngodon piceus*)、鲮(*Oreochromis niloticus*)和鲢(*Cirrhinus molitorella*)胰 α -淀粉酶基因 5'端序列使用引物(F: 5'-CCCAATCAAATGGATTTC-3', R: 5'-AAACAGGTGGACGATGGCA-3')克隆获得。PCR 反应条件为: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后测序,测序引物与扩增引物相同。然后,从 NCBI 数据库获得了 27 种鱼类胰 α -淀粉酶基因 5'端序列(表 1)。分析选取的胰 α -淀粉酶基因 5'端调控序列为转录起始位点(TSS)上游 824 bp 序列,序列从 NCBI 数据库手动获得。首先在基因类别 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) 上搜索

pancreatic α -amylase, 然后从 sequence text view 窗口中手动提取序列。

1.2 系统发育和转录因子结合位点分析

利用 NCBI 数据库的 Blast 软件(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行分析,确定获得的序列为 α -淀粉酶基因 5'端序列。使用 MEGA5.1 软件对序列进行比对分析,构建系统进化树;采用最大似然法(maximum likelihood), Bootstrap Replications 设置为 1000,使用 Hasegawa-Kishino-Yano 模型,将非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)设置为外围支。使用 NNPP (https://fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)分析确定转录起始位点(TSS)。利用在线软件 LASAGNA-Search 2.0 (https://biogrid-lasagna.engr.uconn.edu/lasagna_search/)进行转录因子结合位点的分析, Matrix-Derived 模型选择 TRANSFAC Matrices, 其余参数均为在线设置的默认参数^[13]。

1.3 鱼类营养阶层及食性分类

鱼类营养级位置 TP (trophic position)的数据是从 FishBase 网站(<https://www.fishbase.in/search.php?lang=scChinese>)获得^[14]。根据营养阶层值的大小,参考其他相关文献^[15],本文将研究的鱼类划分为 3 类:植食性(herbivore), troph<2.5; 杂食性(omnivore), 2.5<troph<3.5; 和肉食性(carnivore), troph>3.5(表 1)。

1.4 鱼类食性与转录调控因子关系分析

在 PRIMER 6 软件中利用百分比相似性分析(SIMPER)解析了不同食性鱼类的胰 α -淀粉酶基因转录调控因子的组成差异。

表 1 本研究选取的 32 种鱼类及相关信息
Tab. 1 Information of the 32 fishes used in this study

种类 species	目 order	科 family	序列来源 sequence source	营养阶层 trophic position	食性 feeding habit	
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	鲤形目	Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae	本研究 this study	2.0±0.00	草食性 herbivore
鲮 <i>Cirrhinus molitorella</i>	鲤形目	Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae	本研究 this study	2.0±0.00	草食性 herbivore
鲫 <i>Carassius auratus</i>	鲤形目	Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae	数据库 NCBI	2.0±0.00	草食性 herbivore
鳊 <i>Aristichthys nobilis</i>	鲤形目	Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae	本研究 this study	2.8±0.33	杂食性 omnivore
犀角金线鲃 <i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i>	鲤形目	Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae	数据库 NCBI	2.9±0.30	杂食性 omnivore
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	鲤形目	Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae	数据库 NCBI	3.1±0.00	杂食性 omnivore
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	鲤形目	Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae	数据库 NCBI	3.1±0.10	杂食性 omnivore

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab. 1 continued)

种类 species	目 order	科 family	序列来源 sequence source	营养阶层 trophic position	食性 feeding habit
青鱼 <i>Mylopharyngodon piceus</i>	鲤形目 Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae	本研究 this study	3.2±0.44	杂食性 omnivore
鳊 <i>Ochetobius elongatus</i>	鲤形目 Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae	本研究 this study	3.4±0.40	杂食性 omnivore
大弹涂鱼 <i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	鲈形目 Perciformes	虾虎鱼科 Gobiidae	数据库 NCBI	2.0±0.00	草食性 herbivore
深裂眶锯雀鲷 <i>Stegastes partitus</i>	鲈形目 Perciformes	雀鲷科 Pomacentridae	数据库 NCBI	2.0±0.00	草食性 herbivore
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	鲈形目 Perciformes	慈鲷科 Cichlidae	数据库 NCBI	2.0±0.00	草食性 herbivore
岩剑带鲷 <i>Xiphister mucosus</i>	鲈形目 Perciformes	线鲷科 Stichaeidae	数据库 NCBI	2.2±0.10	草食性 herbivore
堇菜色猿线鲷 <i>Cebidichthys violaceus</i>	鲈形目 Perciformes	线鲷科 Stichaeidae	数据库 NCBI	2.3±0.20	草食性 herbivore
攀鲈 <i>Anabas testudineus</i>	鲈形目 Perciformes	攀鲈科 Anabantidae	数据库 NCBI	3.0±0.40	杂食性 omnivore
眼斑双锯鱼 <i>Amphiprion ocellaris</i>	鲈形目 Perciformes	雀鲷科 Pomacentridae	数据库 NCBI	3.1±0.36	杂食性 omnivore
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	鲈形目 Perciformes	石首鱼科 Sciaenidae	数据库 NCBI	3.7±0.56	肉食性 carnivore
尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i>	鲈形目 Perciformes	尖吻鲈科 Latidae	数据库 NCBI	3.8±0.60	肉食性 carnivore
条纹鲇 <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	鲶形目 Siluriformes	巨鲶科 Pangasiidae	数据库 NCBI	3.1±0.46	杂食性 omnivore
黄颡鱼 <i>Tachysurus fulvidraco</i>	鲶形目 Siluriformes	鲿科 Bagridae	数据库 NCBI	3.5±0.10	肉食性 carnivore
墨西哥丽脂鲤 <i>Astyanax mexicanus</i>	脂鲤目 Characiformes	脂鲤科 Characidae	数据库 NCBI	3.2±0.38	杂食性 omnivore
海洋青鳉 <i>Oryzias melastigma</i>	颌针鱼目 Beloniformes	异鳉科 Adrianichthyidae	数据库 NCBI	3.3±0.40	杂食性 omnivore
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	颌针鱼目 Beloniformes	异鳉科 Adrianichthyidae	数据库 NCBI	3.4±0.45	杂食性 omnivore
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	鲀形目 Tetraodontiformes	鲀科 Tetraodontidae	数据库 NCBI	3.6±0.57	肉食性 carnivore
半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	鲽形目 Pleuronectiformes	舌鲷科 Cynoglossidae	数据库 NCBI	3.7±0.60	肉食性 carnivore
电鳗 <i>Electrophorus electricus</i>	裸背电鳗目 Gymnotiformes	裸背电鳗科 Gymnotidae	数据库 NCBI	3.9±0.52	肉食性 carnivore
美丽硬仆骨舌鱼 <i>Scleropages formosus</i>	骨舌鱼目 Osteoglossiformes	骨舌鱼科 Osteoglossidae	数据库 NCBI	3.9±0.63	肉食性 carnivore
斑点雀鲷 <i>Lepisosteus oculatus</i>	雀鲷目 Lepisosteiformes	雀鲷科 Lepisosteidae	数据库 NCBI	4.0±0.66	肉食性 carnivore
白斑狗鱼 <i>Esox lucius</i>	狗鱼目 Esociformes	狗鱼科 Esocidae	数据库 NCBI	4.1±0.40	肉食性 carnivore
银大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus kisutch</i>	鲑形目 Salmoniformes	鲑科 Salmonidae	数据库 NCBI	4.2±0.70	肉食性 carnivore
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	鲑形目 Salmoniformes	鲑科 Salmonidae	数据库 NCBI	4.5±0.30	肉食性 carnivore
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	鲑形目 Salmoniformes	鲑科 Salmonidae	数据库 NCBI	4.1±0.30	肉食性 carnivore

2 结果与分析

2.1 鱼类胰 α -淀粉酶基因 5'端序列

克隆获得草鱼、鳊、青鱼、鲮和鳙 α -淀粉

酶基因序列片段长度分别为 1328 bp、949 bp、1245 bp、954 bp、1299 bp, 其中外显子 1 部分序列长度为 96 bp, 编译相同的氨基酸序列(图 1)。使用 NCBI 数据库的 Blast 软件进行在线分析, 和

其他鱼类相比,这 5 种鱼类 α -淀粉酶基因外显子部分序列高度保守,而 5'端序列差异非常大。确定实验克隆获得的序列为鱼类胰 α -淀粉酶基因 5'端序列。

利用在线软件 NNPP 分析了这 5 种鱼类 α -淀粉酶基因 5'端序列的转录起始位点 TSS(+1), (图

1)。在 α -淀粉酶基因转录起始位点上游-17(-19)处存在 TATA-box,但是鳊的 TATA-box 序列“GGATATAAACTGCAC”和其他 4 种鱼类“GTATATAAACTGCAC”有一个碱基的差异 G/T,而且鳊 α -淀粉酶基因紧邻 TATA-box 上游序列有 23 bp 的碱基缺失。

草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	GAGTTCCTGATTGGCCAGAGGAAAAATGTCATTTTGTATATAAACTGCACATGAGCCTAGGTTTGTGTAGGTTTCTCTGAACCTAGGGAAGGATGA +33	
	TATA-box	+1
鳊 <i>Aristichthys nobilis</i>	GAGTTCCTGATTGGCCAGAGGAAAAATGTAATTTGTATATAAACTGCACATGAACCTAGGTTTGTGTAGGTTTCTCTGAACCTAGGGAAGGATGA +33	Met
	TATA-box	+1
鲢 <i>Cirrhinus molitorella</i>	GAGTTCCTGATTGGCCAGAGGAAAAATGTCATTTTGTATATAAACTGCACATGAGCCTAGGTTGTGTAGGTTTCTCTGAACCTAGGGAAGGATGA +33	Met
	TATA-box	+1
青鱼 <i>Mylopharyngodon piceus</i>	GAGTTCCTGATTGGCCAGAGGAAAAATGTCATTTTGTATATAAACTGCACATGAGCCTAGGTTTGTGTAGGTTTCTCTGAACCTAGGGAAGGATGA +33	Met
	TATA-box	+1
鳊 <i>Ochetobius elongatus</i>	GACATCCCTGATT-----GGATATAAACTGCACATGAGCCTAGGTTTGTGTAGGTTTCTCTGAACCTAGGGAAGGATGA +31	Met
	TATA-box	+1
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	AGCTTCTAATCTTGGCAACATGCTTGGACTGAGCCTCGCTCAGTTTCAGCCCAAAACCAAAAGATGGAAGAACTGCCATCGTCCACCTGTTT	+125
	K L L I L A T L L G L S L A Q F N P N T K N G R T A I V H L F	
鳊 <i>Aristichthys nobilis</i>	AGCTTCTAATCTTGGCAACGTTGCTTGGACTGAGCCTCGCTCAGTTTCAGCCCAAAACCAAAATGGAAGAACTGCCATCGTCCACCTGTTT	+125
	K L L I L A T L L G L S L A Q F N P N T K N G R T A I V H L F	
鲢 <i>Cirrhinus molitorella</i>	AGCTTCTAATCTTGGCAACACTGCTTGGACTGAGCCTCGCTCAGTTTCAGCCCAAAACCAAAAGATGGAAGAACTGCCATCGTCCACCTGTTT	+125
	K L L I L A T L L G L S L A Q F N P N T K N G R T A I V H L F	
青鱼 <i>Mylopharyngodon piceus</i>	AGCTTCTAATCTTGGCAACACTGCTTGGACTGAGCCTCGCTCAGTTTCAGCCCAAAACCAAAAGATGGAAGAACTGCCATCGTCCACCTGTTT	+125
	K L L I L A T L L G L S L A Q F N P N T K N G R T A I V H L F	
鳊 <i>Ochetobius elongatus</i>	AGCTTCTAATCTTGGCAACGCTGCTTGGACTGAGCCTCGCTCAGTTTCAGCCCAAAACCAAAAGATGGAAGAACTGCCATCGTCCACCTGTTT	+123
	K L L I L A T L L G L S L A Q F N P N T K N G R T A I V H L F	

图 1 克隆获得序列的部分片段

+1: 转录起始位点。

Fig. 1 The partial of cloning sequences

+1: Transcription initiation site.

2.2 转录因子结合位点分析

启动子序列一般为转录起始位点(TSS)上游约 2 kb 的区域^[16],位于启动子区域的转录因子结合位点在基因表达调控过程中起着非常重要的作用。本文根据获得序列长度选取转录起始位点上游 824 bp 区域进行分析。在基因类别(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)上搜索 pancreatic alpha-amylase,从结果列表中筛选鱼类胰 α -淀粉酶基因,然后在 sequence text view 窗口中手动提取序列,选取转录起始位点上游 824 bp 序列用于转录因子结合位点分析,以此在 NCBI 数据库中提取了 27 种鱼类胰 α -淀粉酶基因启动子序列。因此,本文共有 32 种鱼类胰 α -淀粉酶基因启动子序列用于转录因子结合位点分析。

利用在线软件 LASAGNA-Search 2.0 对 32 种鱼类胰 α -淀粉酶基因启动子序列进行转录因子结合位点的分析,得到各启动子序列所包含的转录因子的名称、序列和序列上的位置等信息。32 种鱼类胰 α -淀粉酶基因启动子序列包含的转录因子种类的数量在 40~98(图 2)。

根据不同食性鱼类胰 α -淀粉酶基因中存在的转录因子种类的差异,利用 SIMPER 分析,筛选影响鱼类食性差异的主要转录因子。将不同食性鱼类之间转录因子组成相异性贡献率大于 3.5% 的转录因子作为决定鱼类食性差异的潜在转录因子。植食性-肉食性的转录因子组成差异主要体现在 E47、C/EBPalpha、NF-Y 和 Pax-2;植食性-杂食性的转录因子组成差异主要体现在 deltaEF1、MyoD、NF-Y、AREB6 和 Pax-2;杂食性-肉食性的转录因子组成差异主要体现在 GATA-1、SRY、MyoD、HFH-8、AREB6、Pax-2、STAT5A 和 AP-1 (表 2)。

2.3 启动子序列分子进化分析

本文研究的 32 种鱼类隶属 12 目、19 科(表 1)。利用胰 α -淀粉酶基因对 32 种鱼类进行系统发育分析,根据胰 α -淀粉酶基因启动子序列构建了系统进化树。结果显示,鲈形目鱼类深裂眶锯雀鲷、莼菜色猿线鲷、攀鲈、眼斑双锯鱼、大弹涂鱼、尖吻鲈和大黄鱼聚为一类;鲤形目鱼类草鱼、鳊、青鱼、鲢、鳊和斑马鱼聚为一类(图 3)。

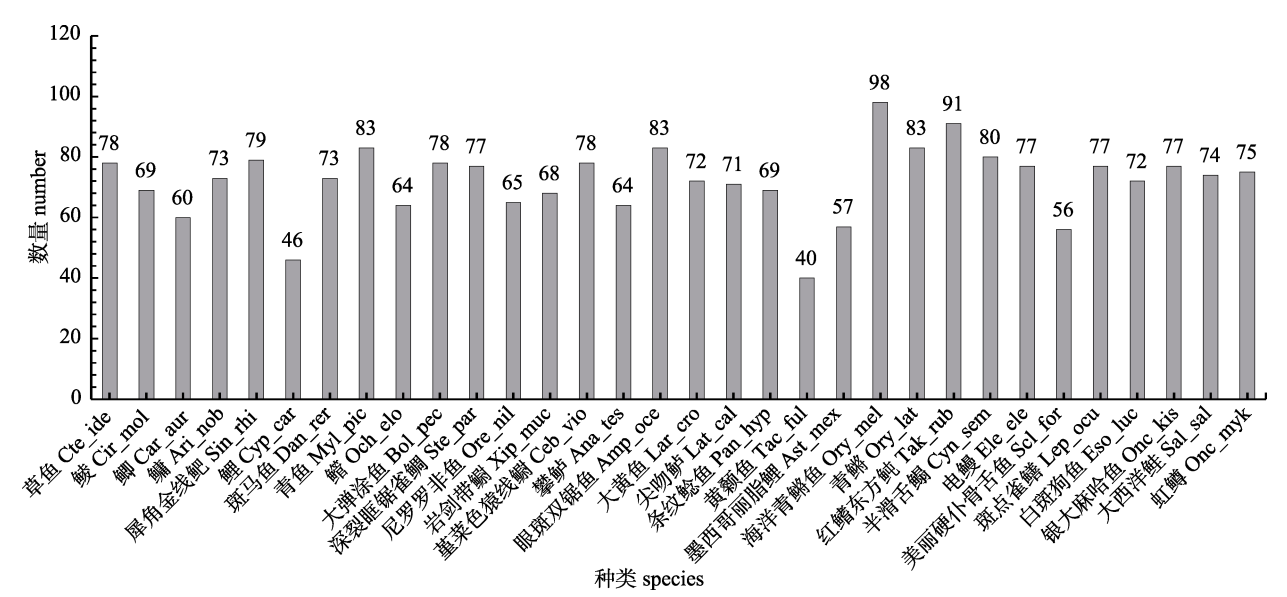


图 2 32 种鱼类转录因子类型的数量

Fig. 2 The number of the transcription factor types of the 32 fish species

表 2 不同食性鱼类转录因子的差异性分析结果

Tab. 2 Analysis of the dissimilarity of transcription factors in different feeding habits fishes						
杂食性+草食性组; 平均差异性=98.72 groups omnivore & herbivore; average dissimilarity=98.72						
转录因子类型 transcription factor type	杂食性 omnivore 平均丰度 av. abund	草食性 herbivore 平均丰度 av. abund	平均差异性 av. diss	差异性标准差 diss/SD	贡献率/% contrib.	累计贡献率% cum.
MyoD	0.03	0.02	3.92	0.23	3.97	3.97
NF-Y	0.02	0.03	3.84	0.23	3.89	7.86
Pax-2	0.02	0.03	3.77	0.22	3.81	11.67
AREB6	0.02	0.02	3.72	0.22	3.77	15.44
deltaEF1	0.02	0.02	3.52	0.22	3.57	19.01
杂食性+肉食性组; 平均差异性=98.96 groups omnivore & carnivore; average dissimilarity=98.96						
转录因子类型 transcription factor type	杂食性 omnivore 平均丰度 av. abund	肉食性 carnivore 平均丰度 av. abund	平均差异性 av. diss	差异性标准差 diss/SD	贡献率/% contrib.	累计贡献率% cum.
SRY	0.02	0.02	4.12	0.23	4.17	4.17
STAT5A	0.02	0.02	3.88	0.22	3.92	8.09
MyoD	0.03	0.01	3.68	0.21	3.72	11.8
GATA-1	0.02	0.02	3.66	0.21	3.7	15.5
AREB6	0.02	0.02	3.66	0.21	3.7	19.2
HFH-8	0.02	0.02	3.62	0.21	3.66	26.53
Pax-2	0.02	0.02	3.62	0.21	3.66	30.19
AP-1	0.02	0.02	3.62	0.21	3.66	33.85
草食性+肉食性组; 平均差异性=98.88 groups herbivore & carnivore; average dissimilarity=98.88						
转录因子类型 transcription factor type	草食性 herbivore 平均丰度 av. abund	肉食性 carnivore 平均丰度 av. abund	平均差异性 av. diss	差异性标准差 diss/SD	贡献率/% contrib.	累计贡献率% cum.
Pax-2	0.03	0.02	4.67	0.25	4.73	4.73
NF-Y	0.03	0.02	3.72	0.22	3.76	8.49
E47	0.02	0.02	3.57	0.21	3.61	12.1
C/EBPalpha	0.02	0.02	3.57	0.21	3.61	15.71

Note: av. abund=average abundance, av. diss=average dissimilarity, contrib.=contribution, cum.=cumulative.

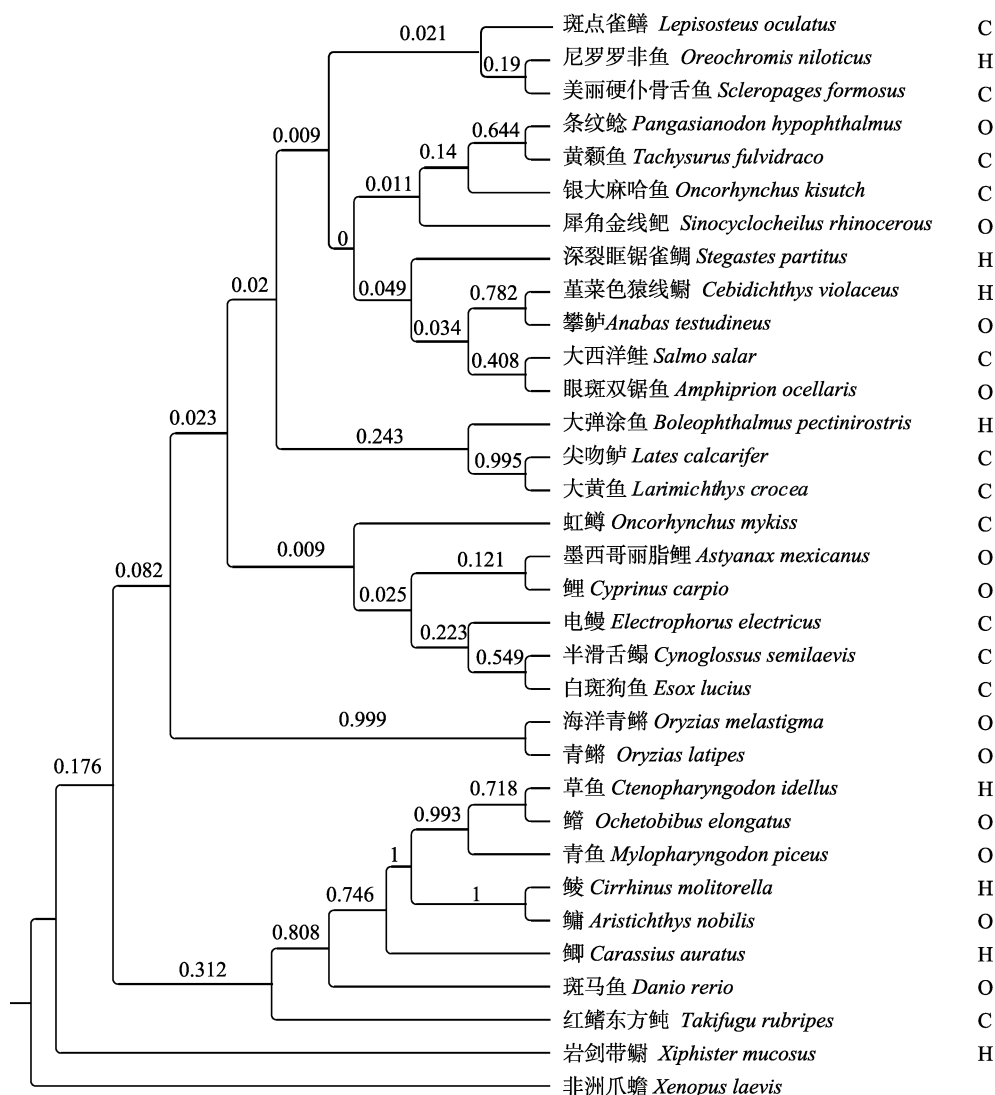


图 3 淀粉酶基因 5'侧翼序列的系统发育树分析

C: 肉食性; H: 草食性; O: 杂食性.

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of the amylase gene 5' flanking sequence

C: carnivore; H: herbivore; O: omnivore.

进化树分支中相同食性没有聚为一类, 各分支中存在不同食性鱼类。表明鱼类 α -淀粉酶基因启动子序列在进化过程中比较保守, 鱼类中 α -淀粉酶受系统发育的影响比食物的影响更大。关系相近的鱼类由于食性相关的结构和功能的特殊化引起摄食习惯的差异, 呈现食性的分化。

3 讨论

3.1 胰 α -淀粉酶基因 5'端调控序列相似性

对 32 种鱼类胰 α -淀粉酶基因 5'端序列进行研究, 选取转录起始位点上游 824 bp 区域进行分析, 研究不同食性鱼类胰 α -淀粉酶基因转录调控序列

与食性之间的关系。不同鱼类胰 α -淀粉酶基因 5'端序列相似度很低, German 等^[17]在鱼类淀粉酶基因的研究中发现, 莖菜色猿线鲷和岩剑带鲷淀粉酶基因在起始密码子至上游 167 bp 序列中相似度很高, 在上游 167 bp 以后序列的相似性很低, 而且出现很多片段缺失。淀粉酶基因编码区序列在不同鱼类中是高度保守的, 胡永乐等^[18]研究斜带石斑鱼淀粉酶基因的结果显示编码区序列在不同鱼类中相似性高达 91.8%; 陈亮等^[12]分析鳊的淀粉酶基因编码区序列与斑马鱼的同源性为 79.7%。基因 5'端序列在核苷酸序列上经历了快速的进化, 与功能基因编码区序列进化相比, 基因 5'端序列

在核苷酸序列上具有较低的相似性。虽然基因调控序列核苷酸序列相似性比较低,但在功能上调控序列的进化是比较保守的^[19]。基因转录调控的进化是通过改变基因的表达方式,而不是改变基因编码的氨基酸序列推动生物的进化的^[20]。

3.2 胰 α -淀粉酶基因转录因子与食性关系

Inomata 等^[21]对果蝇淀粉酶基因 5'端序列进行了研究,发现了 2 个转录因子在果蝇幼虫摄食淀粉时能够提高淀粉酶活性,另外还发现 1 个转录因子可以对食物的不同做出反应。Ma 等^[11]对尖吻鲈淀粉酶基因启动子研究发现转录因子 GR 对基因的表达具有调控作用。本研究通过分析不同食性鱼类胰 α -淀粉酶基因 5'端序列转录因子的差异,找出潜在的与鱼类食性相关的 12 个转录因子, E47、C/EBPalph、NF-Y、Pax-2、deltaEF1、MyoD、AREB6、GATA-1、SRY、HFH-8、STAT5A 和 AP-1。与植食性/肉食性差异相关的转录因子有 E47、C/EBPalph、NF-Y 和 Pax-2; 与植食性/杂食性差异相关的转录因子有 deltaEF1、MyoD、NF-Y、AREB6 和 Pax-2; 与杂食性/肉食性差异相关的转录因子有 GATA-1、SRY、MyoD、HFH-8、AREB6、Pax-2、STAT5A 和 AP-1。糖皮质激素受体(GR)转录因子能够激活代谢相关的基因。Hemmer 等^[22]通过小鼠遗传学研究,发现 GR 调控肝脏糖脂代谢需要 E47,而 E47 的缺失可以阻止 GCs 引起的高血糖和肝脂肪变性的发生, E47 和 GR 共同作为代谢促进剂和增强剂。本研究中转录因子 E47 在草食性和肉食性鱼类中的差异贡献率为 3.57%,是影响草食性和肉食性鱼类 α -淀粉酶基因表达的潜在影响因子,在草食性鱼类 α -淀粉酶基因的表达中发挥更强促进作用。在肝脏组织中,转录因子 C/EBPalph 通过不同的机制可以调控糖异生和脂肪的生成。对糖异生过程进行调控时, C/EBPalph 和 FOXO1 共同作用于 IRE 控制的启动子,从而调控目的基因(例如 PCK1、G6PC)的表达。本研究表明,转录因子 C/EBPalph 对草食性和肉食性鱼类转录因子差异贡献率有 3.57%,不同食性之间的差异可能引起鱼类 α -淀粉酶基因表达的不同。转录因子 NF-Y 在糖代谢过程中发挥着重要促进作用^[23]。此外,转录因子

NF-Y 可以正向调控核心时钟元件 ARNTL/BMAL1 的转录^[24]。ARNTL/BMAL1 是转录激活因子,是昼夜节律钟的核心组成部分。昼夜节律钟是一种内部计时系统,通过产生约 24 小时的基因表达昼夜节律来调节各种生理过程,这些基因表达的昼夜节律被转化为新陈代谢和行为的节律。Wang 等^[25]在草鱼的基因组研究中,发现草鱼在草食性转化过程中,肠道中昼夜节律相关基因的表达模式发生了重设,草鱼可能通过持续高强度的食物摄入,获取足够多的可利用营养以维持其快速生长。说明昼夜节律钟对鱼类食性的差异有着重要的影响。本研究中转录因子 NF-Y 也是草食性鱼类与杂食性和肉食性鱼类 α -淀粉酶基因转录因子差异的重要影响因素。转录因子 Pax-2 在胰高血糖素基因表达中具有转录激活作用^[26]。本研究结果显示转录因子 Pax-2 在草食性与杂食性和肉食性鱼类中均存在较大差异,差异贡献率分别为 3.77%和 4.67%,推测 Pax-2 是草食性鱼类与杂食性和肉食性鱼类 α -淀粉酶表达差异的重要作用因子。糖皮质激素主要作用于碳水化合物和蛋白质的代谢。糖皮质激素刺激可以引起细胞状态或活动变化的任何过程(在运动、分泌、酶的产生、基因表达等方面)。转录因子 MyoD 参与细胞对糖皮质激素刺激的反应,调节细胞的代谢过程。本研究中,转录因子 MyoD 在杂食性鱼类与草食性和肉食性鱼类 α -淀粉酶基因中都有较大的差异,并且在肉食性鱼类中出现的概率较低。Watanabe 等^[27]将融合 Atp1a1 的 AREB6 的 cDNA 共转染到报告荧光素酶基因中,结果表明,AREB6 蛋白可根据 cDNA 的数量和细胞类型增强或抑制基因的启动子活性。鱼类胰 α -淀粉酶的研究是鱼类消化生理研究的重要内容之一,鱼类淀粉酶活性的提高可以促进对营养物质的消化吸收,加快鱼类的生长。通过研究鱼类胰 α -淀粉酶基因表达的调控因子,在实际中可以添加表达相关调控因子,促进鱼类生长发育,提高营养物质的利用率。

本研究首次对鱼类胰 α -淀粉酶基因 5'端调控序列进行分子系统发育分析。分子系统发育分析表明,系统进化树结果与传统形态分类学大体相

符。目前, 基于鱼类消化酶基因的代谢生理功能及表达调控机理研究、食性分化机理研究还比较少。本研究分析了胰 α -淀粉酶基因 5'端序列的转录因子及系统发育与鱼类食性的关系, 发现胰 α -淀粉酶基因 5'端调控序列的转录调控因子与鱼类食性分化具有一定的关系, 转录因子 E47、C/EBP α 、NF-Y、Pax-2、MyoD 等在不同食性鱼类 α -淀粉酶基因转录因子差异性分析中表现出较大的贡献率, 是影响不同食性鱼类 α -淀粉酶基因表达的重要作用因子, 通过本研究以期对鱼类食性分化分子机理研究提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Takahiro N, Yusuke N, Mitsuru E, et al. Primary structure of human salivary α -amylase gene[J]. *Gene*, 1986, 41(2-3): 299-304.
- [2] Akira H, Mitsuru E, Naohiro T, et al. Primary structure of human pancreatic α -amylase gene: Its comparison with human salivary α -amylase gene[J]. *Gene*, 1987, 60(1): 57-64.
- [3] Douglas S E, Mandla S, Gallant J W. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*[J]. *Aquaculture*, 2000, 190(3-4): 247-260.
- [4] Ni S W, Gui Y M, Liu H L. A comparative research on amylase activities among grass carp, common carp, silver carp, bighead carp, tilapia nilotica[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 1992, 7(1): 24-31. [倪寿文, 桂远明, 刘焕亮. 草鱼、鲤、鲢、鳙和尼罗非鲫淀粉酶的比较研究[J]. 大连水产学院学报, 1992, 7(1): 24-31.]
- [5] Agrawal V P, Sastry K V, Kaushab S K. Digestive enzymes of three teleost fishes[J]. *Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 1975, 46(2): 93-101.
- [6] Hidalgo M C, Urea E, Sanz A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities[J]. *Aquaculture*, 1999, 170(3-4): 267-283.
- [7] Chen C N. Molecular cloning and gene expression of α -amylase in Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus* Bleeker [D]. Chongqing: Southwest University, 2007. [陈春娜. 胭脂鱼 α -淀粉酶的 cDNA 克隆与组织表达研究[D]. 重庆: 西南大学, 2007.]
- [8] Qin B Y, Chang Q, Yu C L, et al. Molecular cloning of α -amylase gene in half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) and its expression in response to dietary taurine[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(4): 988-995. [秦帮勇, 常青, 于朝磊, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther) α -淀粉酶基因的克隆及牛磺酸对其表达的影响[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(4): 988-995.]
- [9] Vaquerizas J M, Kummerfeld S K, Teichmann S A, et al. A census of human transcription factors: Function, expression and evolution[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(4): 252-263.
- [10] Moal J, Daniel J Y, Sellos D, et al. Amylase mRNA expression in *Crassostrea gigas* during feeding cycles[J]. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 2000, 170(1): 21-26.
- [11] Ma P S, Liu Y S, Reddy K P, et al. Characterization of the seabass pancreatic α -amylase gene and promoter[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2004, 137(1): 78-88.
- [12] Chen L, Liang X F, Wang L, et al. Molecular cloning and sequences analysis of trypsin, amylase and pepsinogen genes from Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 25(12): 1115-1123. [陈亮, 梁旭方, 王琳, 等. 鳊鱼胰蛋白酶和淀粉酶与胃蛋白酶原基因的克隆与序列分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(12): 1115-1123.]
- [13] Lee C, Huang C H. LASAGNA-Search: An integrated web tool for transcription factor binding site search and visualization[J]. *BioTechniques*, 2013, 54(3): 141-153.
- [14] Froese R, Pauly D. FishBase[DB/OL]. World Wide Web Electronic Publication, 2019[2019.03]. <http://www.fishbase.org>.
- [15] Xiong Y, Zhang M, Zhang H, et al. Preliminary research on relationship between fish functional morphology and trophic position[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2015, 27(3): 466-474. [熊鹰, 张敏, 张欢, 等. 鱼类形态特征与营养级位置之间关系初探[J]. 湖泊科学, 2015, 27(3): 466-474.]
- [16] Li X H, Yang J P, Zhu S L, et al. Insight into the combinatorial transcriptional regulation on α -amylase gene in animal groups with different dietary nutrient content[J/OL]. *Genomics*, 2019, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754318307389?via%3Dihub>.
- [17] German D P, Foti D M, Heras J, et al. Elevated gene copy number does not always explain elevated amylase activities in fishes[J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2016, 89(4): 277-293.
- [18] Hu Y L, Liang X F, Wang L, et al. Molecular cloning and sequence analysis of pancreatic trypsinogen and amylase from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2010, 29(5): 125-131. [胡永乐, 梁旭方, 王琳, 等. 斜带石斑鱼胰蛋白酶原和淀粉酶全长 cDNA 的克隆与序列分析[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 125-131.]
- [19] Ludwig M Z, Bergman C, Patel N H, et al. Evidence for stabilizing selection in a eukaryotic enhancer element[J]. *Nature*, 2000, 403(6769): 564-567.
- [20] Shapiro M D, Marks M E, Peichel C L, et al. Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks[J]. *Nature*, 2004, 428(6984): 717-723.
- [21] Inomata N, Nakashima S. Short 5'-flanking regions of the Amy gene of *Drosophila kikkawai* affect amylase gene expression and respond to food environments[J]. *Gene*, 2008, 412(1-2): 102-109.
- [22] Hemmer M C, Wierer M, Schachtrup K, et al. E47 modulates hepatic glucocorticoid action[J]. *Nature Communications*,

- 2019, 10: 306.
- [23] Goel A, Mathupala S P, Pedersen P L. Glucose metabolism in cancer[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(17): 15333-15340.
- [24] Kawata H, Yamada K, Shou Z F, et al. Zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) 2, a novel member of the ZHX family, functions as a transcriptional repressor[J]. Biochemical Journal, 2003, 373(3): 747-757.
- [25] Wang Y P, Lu Y, Zhang Y, et al. The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation[J]. Nature Genetics, 2015, 47(6): 625-631.
- [26] Hoffmeister A, Ropolo A, Vasseur S, et al. The HMG-I/Y-related protein p8 binds to p300 and Pax2 trans-activation domain-interacting protein to regulate the trans-activation activity of the Pax2A and Pax2B transcription factors on the glucagon gene promoter[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(25): 22314-22319.
- [27] Watanabe Y, Kawakami K, Hirayama Y, et al. Transcription factors positively and negatively regulating the Na, K-ATPase α 1 subunit gene[J]. The Journal of Biochemistry, 1993, 114(6): 849-855.

Analysis of the relationship between the pancreatic alpha amylase gene 5' flanking sequence and the feeding habits of fish

ZHU Shuli, ZHANG Yingqiu, CHEN Weitao, YANG Jiping, LI Jie, WU Zhi, LI Xinhui

Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China

Abstract: In this study, we aimed to examine the relationship between the pancreatic alpha-amylase gene 5' flanking sequence and the feeding habits of fish by analyzing the differences of alpha-amylase gene transcription factors in different fishes. Pancreatic alpha-amylase gene 5' flanking sequences were obtained from a total of 32 fish species. Five of them were obtained by PCR and the remaining were obtained by searching the NCBI database. The length of the obtained 5' flanking sequences was 824 bp. Then, the transcription factors and phylogenetic relationship analyses were carried out for these pancreatic alpha-amylase gene 5' flanking sequences. Fishes were divided into herbivores, omnivores, and carnivores, according to their different trophic positions. The percentage similarity analysis was used to study the differences in the composition of transcription factors in fishes with different feeding habits. The similarity of the pancreatic alpha-amylase gene 5' flanking sequence among different fishes was very low. The pancreatic alpha-amylase gene 5' flanking sequences of 32 fish species contained a species transcription factor that ranged from 40 to 98. The results of the percentage similarity analysis showed that there were differences in the transcription factors of pancreatic alpha-amylase gene 5' flanking sequences among fishes with different feeding habits. Differences between the Herbivore and Carnivore groups were mainly found in the E47, C/EBPalpha, NF-Y, and Pax-2 transcription factors. Differences between the Herbivore and Omnivore groups were mainly found in the deltaEF1, MyoD, NF-Y, AREB6, and Pax-2 transcription factors. Differences between the Omnivore and Carnivore groups were mainly found in the GATA-1, SRY, MyoD, HFH-8, AREB6, Pax-2, STAT5A, and AP-1 transcription factors. These transcription factors play an important role in glucose metabolism and can enhance or inhibit gene expression. In liver glucose and lipid metabolism, the E47 and GR transcription factors act jointly as metabolism promoters and enhancers. In the regulation of gluconeogenesis, C/EBPalpha and FOXO1 act together on the IRE controlled promoter to regulate the expression of target genes such as PCK1 and G6PC. Transcription factor NF-Y plays an important role in promoting glucose metabolism. The phylogenetic tree results were generally consistent with the traditional morphological taxonomy. Fishes with the same feeding habits did not cluster together in the phylogenetic tree. The results indicated that there were several transcription factors in the pancreatic alpha-amylase gene 5' flanking sequences that were related to the feeding habits of fish. There is a certain relationship between transcription factors and the dietary differentiation of fish.

Key words: feeding habits; fish; amylase gene; 5' flanking sequence

Corresponding author: LI Xinhui. E-mail: lxhui01@aliyun.com