

DOI: 10.12264/JFSC2020-0330

大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* 基因克隆及低温胁迫下的表达差异分析

张东玲, 徐浩, 张震西, 王志勇

集美大学水产学院, 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021

摘要: 为探究 *cGPDH* 和 *mGPDH* 在大黄鱼(*Larimichthys crocea*)适应低水温过程中所起的调控作用, 本研究采用 RACE-PCR 技术克隆了大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* 基因全长 cDNA 序列, *cGPDH* 和 *mGPDH* 基因序列全长分别为 1577 bp 和 2319 bp, 包含长度为 1050 bp 和 2193 bp 的开放阅读框, 分别编码 349 和 730 个氨基酸; 氨基酸比对分析发现大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* 与其他硬骨鱼类同源性较高, *cGPDH* 包含一个特征性序列 GXGXXG, *mGPDH* 包含 2 个 EF-hand 功能结构域; 进化树分析表明大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* 与其他硬骨鱼类聚为一枝, 与棘头梅童鱼(*Collichthys lucidus*)亲缘关系最近。生物信息学分析发现大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* 均不含跨膜结构域, *cGPDH* 亚细胞定位于细胞质可能性最大, 三维结构包含一个 C 端 α 螺旋底物结合结构, 8 个 N 端 β 折叠结构和一个单体结构, *mGPDH* 定位于线粒体的可能性最大。qRT-PCR 分析显示 *cGPDH* 和 *mGPDH* 在所检测的 12 个组织中均有表达, *cGPDH* mRNA 主要表达在血液, 其次为鳃、头肾和肠道, 肌肉组织中表达量最低; 而 *mGPDH* mRNA 在头肾表达量最高, 肌肉组织表达量最低。在持续的冷胁迫下, 水温 15 °C 到 9 °C 每天降温 2 °C, 9 °C 到 7 °C 每天降温 1 °C, 7 °C 保持 5 d, 大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* 在脑和肌肉表达趋势均显著上调。研究结果表明, *cGPDH* 和 *mGPDH* 基因可能在大黄鱼适应冬季低水温过程中发挥重要作用。

关键词: 大黄鱼; *cGPDH*; *mGPDH*; 低温; 基因调控; 基因表达

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)03-0253-12

甘油-3-磷酸脱氢酶(glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH)是糖异生和脂肪代谢的关键酶, 包括 NAD^+ 依赖的 GPDH (cytoplasmic GPDH, *cGPDH*, EC 1.1.1.8)和 FAD^+ 依赖的 GPDH (mitochondrial GPDH, *mGPDH*, EC 1.1.5.3), *cGPDH* 催化磷酸二羟丙酮(DHAP)合成甘油-3-磷酸(G3P), 随后甘油三磷酸酶催化 G3P 脱磷酸合成甘油, 而 *mGPDH* 则催化 G3P 合成 DHAP, 因此, *cGPDH* 和 *mGPDH* 共同控制着磷酸甘油穿梭循环^[1-2]。Vanga Ewart 等^[3]研究发现在低温胁迫下虹香鱼(*Osmerus mordax*)的 *cGPDH* 基因的表达量明显升高, 这与甘油在低温环境下积累的结论是一致的, 表明 *cGPDH* 活性与体内甘油的含量相关。此外,

cGPDH 也与能量的产生相关, 在昆虫 α -甘油磷酸循环中, *cGPDH* 和 *mGPDH* 与线粒体 α -甘油磷酸氧化酶协同作用产生能量, 而这些能量是昆虫飞行过程中肌肉所必需的^[4-6]。同时, *cGPDH* 的活性也是脂肪细胞分化的重要指标^[7]。鉴于甘油的积累、能量的产生、脂肪细胞的分化都与机体冷耐受密切相关, 而全球气候的非正常变化, 鱼类如何适应冬季突变的低水温值得深入研究, 因此探索 *cGPDH* 和 *mGPDH* 在调控鱼类低水温过程中的作用具有重要意义。

水温对于冷血动物, 包括鱼类, 是一个重要的环境因子, 影响着鱼类生理代谢活动。当水温接近于或低于鱼体耐受的最低温度时, 鱼类生理

收稿日期: 2020-10-09; 修订日期: 2020-11-17.

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(U1705231); 福建省自然科学基金项目(2019J01692); 福建省教育厅项目(JT180274); 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室开放课题资助项目(2015fjxcq07); 厦门市科技计划项目(3502Z20193052).

作者简介: 张东玲(1977-), 女, 副教授, 研究方向为水生生物学. E-mail: zhangdongling@jmu.edu.cn

通信作者: 王志勇, 教授, 研究方向为水生生物学. E-mail: zywang@jmu.edu.cn

活动无法调节适应,健康就会受到威胁,甚至出现死亡^[8-10]。大黄鱼是中国近海暖水性鱼类,福建省和浙江省是大黄鱼的主要养殖区域。近年,由于气温的不正常变化,浙江冬季海水温度经常出现低于 7℃时段,而大黄鱼生长最佳温度为 18~25℃,当水温低于 15℃时,大黄鱼摄食减少和生长减缓,低于 7℃时,大黄鱼出现大量死亡,对大黄鱼养殖业造成巨大经济损失^[11-12],因此,有必要研究大黄鱼耐受低水温的机制,以便找到一些切实可行的方法促使大黄鱼适应低水温。本研究主要报道大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* 基因的分子特征、分子进化、生物信息学分析与低温适应下的表达分析。

1 材料与方法

1.1 实验设计和样品采集

冷胁迫实验在浙江省舟山市水产研究所养殖基地进行,实验用的大黄鱼(体重 45.0±5.0 g)由该所提供。对于低温胁迫实验,大黄鱼分为实验组和对照组,每组各 140 尾,在室内水泥池中(3 m×4 m)暂养 2 周,水温设定为 15℃,投喂商业饲料。实验组,水温每天减少 2℃,直到水温达到 9℃,以后每天降低 1℃,直到 7℃,7℃保持 5 d,每天观察大黄鱼行为变化和存活情况;对照组除不降低水温外,所有的处理与实验组相同。降温后,实验组和对照组在起始的 15℃和降温后的

11℃、9℃、7℃(1 d)、7℃(3 d)和 7℃(5 d),共 6 个温度点,分别采集大黄鱼的脑和肌肉,每个温度点每组采集 5 尾鱼。

基因组织表达谱实验:20 尾大黄鱼暂养在 30 L 水桶内 2 周,水温设定为 15℃,投喂商业化饲料,剖取 5 尾大黄鱼,采集每尾鱼的心脏、肝、脾、体肾、头肾、胃、肠道、鳃、皮肤、肌肉和血液组织,共 12 个组织、保存在 RNA 保护液中,以备 RNA 提取。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

采用 TRIzol 试剂盒法提取大黄鱼组织总 RNA,通过 RNase-free DNase I 试剂盒纯化 RNA,37℃,30 min 去除基因组 DNA。琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,Nandodrop 2000 进行纯度分析和浓度测定。根据反转录试剂盒(PrimeScript RT-PCR kit)说明书合成 cDNA 第一条链,以此为模板进行 PCR。

1.3 cGPDH 和 mGPDH 基因全长克隆

根据实验室前期转录组数据,筛选获得 *cGPDH* 和 *mGPDH* 基因部分序列,基因特异性引物通过 Primer 5.0 软件设计(表 1),采用 Nested-RACE 方法扩增基因 3'端,PCR 反应条件为 94℃ 5 min;94℃ 30 s,69/68℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 10 min。然后通过 RT-PCR 确认 *cGPDH* 和 *mGPDH* 基因序列全长,PCR 反应条件为 94℃ 5 min;94℃ 30 s,54℃ 45 s,72℃

表 1 大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* 基因克隆和表达所用引物
Tab. 1 Primers used for *cGPDH* and *mGPDH* cloning and expression analysis in *Larimichthys crocea*

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 purpose
cGPDHF1	CTGGGTCTGATGGAGATGGTCGCCT	RACE 扩增 cGPDH 3'端
cGPDHF2	CAAGTTTCCGTTGTTCTCTGCCGTCT	
mGPDHF1	TGTCAGGAGCGGAAGACGGCAGAG	RACE 扩增 mGPDH 5'端
mGPDHF2	GCAGCAAGTCCTGGAGAGCATCAAC	
cGPDHF	CGAAGGCAACAGAAAGCAACAATAG	确认 cGPDH 序列全长
cGPDHR	CGTTTGTGCGTCTCTGTCTGATG	
mGPDHF	ACCACAAAACAAGAAATCCTGACCG	确认 mGPDH 序列全长
mGPDHR	TTGGCATCCTTTGAAAAATCCTCCT	
cGPDHQF	CAAACCTCCGCATCACCGTC	cGPDH qRT-PCR
cGPDHQR	CAGAATCCAGCACCTACAGCCAC	
mGPDHQF	GTCGGATGTGCCTTAGACGCT	mGPDH qRT-PCR
mGPDHQR	GGGCAATTTCCAGGAGGTTAG	
β-actin-F	TTATGAAGGCTATGCCCTGCC	β-actin qRT-PCR
β-actin-R	TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT	

1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 回收目的产物, 并克隆至 pMD19-T 载体, 由上海 Invitrogen 公司测序。

1.4 *cGPDH* 和 *mGPDH* 基因生物信息学分析

应用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找拼接的大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* 基因 cDNA 序列的开放阅读框。Expert 蛋白分析系统 (<http://www.expasy.org/>) 预测对应蛋白分子量和等电点。Signal 4.0 在线软件预测蛋白的信号肽。SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) 在线预测蛋白三维结构。SMART 4.1 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 NCBI 分析序列蛋白的保守结构域、功能基序。运用 Bioedit 和 ClustalW 软件进行氨基酸序列比对, 用 MEGA 5.0 软件, Neighbor-Joining 方法构建系统进化树。

1.5 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析基因的表达

根据拼接的 *cGPDH* 和 *mGPDH* 基因序列全长设计荧光定量 PCR 特异性引物(表 1), β -actin 基因作为荧光定量反应的内参基因, 实验操作按照 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 荧光定量试

剂盒说明书进行。以反转录的 cDNA 为模板, 确定引物的扩增效率和样品模板浓度。反应总体积为 10 μ L, 包括 cDNA (稀释 100 倍) 1 μ L, 特异性引物各 0.5 μ L, SYBR Primix Ex Taq 5 μ L, ddH₂O 3 μ L。采用两步法进行扩增, 反应条件为 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 60 °C 20 s, 共 40 个循环。每个样品有 3 个重复, 以保证数据的稳定性。大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* 基因 mRNA 相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算, 分析出来的基因表达量由平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示, 并使用 SPSS 19.0 软件进行显著性分析, 用 Duncan 法进行多重比较分析($P < 0.05$ 为显著水平)。

2 结果与分析

2.1 大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* 基因 cDNA 扩增、克隆和全长拼接

克隆片段经测序和拼接, 结果显示 *cGPDH* 序列全长为 1577 bp, 包括 666 bp 的 5'-UTR, 1050 bp 的开放阅读框(ORF), 461 bp 的 3'-UTR, 共编码 349 个氨基酸(图 1)。SMART 预测 *cGPDH* 无典型的结构域, 但 NCBI 保守结构域数据库显示其 C

```

1 CGAAGGCAACAGAAAGCAACAATAGGGGCTTCAGTTCAGCCGATCAGGAGGTTTAGCTCTCTCAAGatgctcgtgaaagaagctgcatcgtcgggtctggaaactggggttcctccatt 120
1 M P G K K V C I V G S G N W G S S I 18
121 gccaaataattggccacaatgtcaaacctccaccgggtttgacccgatgggtgaacatgtgggtttacgaagaggtgatagaaggaggaaagctgacagagatcataatcaggagcac 240
19A K I I G H N V K A S N R F D P M V N M W V Y E E V I E G R K L T E I I N T E H 58
241 gaaaacgtcaaatatctgccaggtcacaaagctgcaaggaatgtggtcgtgttctcagctcactgaagctgtcaaaaggagcaaaagatcctggtctttgtgatccctcatcagttcatt 360
59E N V K Y L P G H K L P R N V V A V P D V T E A V K G A K I L V F V I P H Q F I 98
361 ggcaacctctgtgaccagataaagcctcagctcacggagggaaccatcgggatatacctcatcaaaaggtatcgacgagggccggatggactaaagctcatctcagacattatctcgagag 480
99G N L C D Q I K P H V T E G T I G I S L I K G I D E G P D G L K L I S D I I R E 138
481 aagctagagatcgaggtcagctcgtgatgggggccaacatcgccaacgaggtggcagatgagaagttctgtgaaaccaccatcgggggccaaaatgaggcaaacggcaccattctcaaa 600
139K L E I E V S V L M G A N I A N E V A D E K F C E T T I G A K N E A N G T I F K 178
601 gagctgctcaaaactccaaacttcgcataccgctcgtagagagagcagacacgctggagctgtgaggagctcttaagaatatcgtggctgtaggtgctggtgctgtagcagggcctcggt 720
179E L L Q T P N F R I T V V E E S D T V E L C G A L K N I V A V G A G F C D G L G 218
721 ttggcgacaacaccaaggcggcggtgatccgctgggtctgatgagatggctgccttcgcaagttgttctgcaaaaggcagcgtgagctccaccaccttctggagagctgaggcggtg 840
219F G D N T K A A V I R L G L M E M V A F A K L F C K G S V S S T T F L E S C G V 258
841 gccacctcatcaccacgtctacggaggacgaacccggaagctgcagaggcctttgccaaaacgtccaagctctatcactgagctggaggcagaatgctcaacggccagaagcttcag 960
259A D L I T T C Y G G R N R K V A E A F A K T S K S I T E L E A E M L N G Q K L Q 298
961 ggccacagacctcagctgaggtctacaagctcctacagaaaaggacatgggtgaacaagtttccgtgttctctgcccgtctatcagatctgcttcgaggggcaaaagtgaaagagttc 1080
299G P Q T S A E V Y K L L Q K R D M V N K F P L F S A V Y Q I C F E G K E V K E F 338
1081 atcacctgtctcgaagaccagagcacatgtgaCGGACCAATTCGCAAACTGCTGCTCCTCAGTAACAACATATAACCACTAGAGGGTGAAGAGATTATCATCAGACAGAGAC 1200
339I T C L Q N H P E H M * 349
1201 GCACAAACGGAAACAAAGAGCACTTTGACTTATTTTACCGGTGACATTTCATCATGGATATTTTAAATAGCTATTTAAAGTTTGCTCTTATTTTGTAATGTGTTCTGTACTGTTC 1320
1321 ATTTGGCTCTAAAAATATCGTGTGTTAATAAGCTTTGTTTTCAGTGGCACATGTAAAAATGCAGACCCCTCTGAGGCAAAACCACTCTACTGCCAAAAGTCATTTTGTATGGGTTTG 1440
1441 TCAAGGTTCTTTTCACTACATGACAGTTTACAATTTCAAATCAAACCTTAATGATGCTTTTATCTTTCATGTAAGTTGTTTCTCAATAAAATCAATGAGTAACAAAAAAA 1560
1561 AAAAAAAAAAAAAAAAAA 1577

```

图 1 大黄鱼 *cGPDH* 基因 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列

cDNA 序列中小写字母代表开放阅读框; 大写字母代表 5'和 3'非编码区; *代表终止密码子。

多聚腺苷酸加尾信号(aataaa)用下划线标出; NAD 依赖性 GPDH 超家族保守序列(196-336aa)用下划线标出。

Fig. 1 Nucleotide and predicted protein sequences of *cGPDH* of *Larimichthys crocea*
Lowercase letters in cDNA represent open reading frame (ORF); uppercase letters represent the 5' and 3' noncoding regions; * indicates stop codon. Poly adenosine tail signal (aataaa) is underlined; the conserved sequence of NAD-dependent GPDH (196-336aa) is underlined.

034401.1)、人类(*Homo sapiens* NP_005267.2)的 *cGPDH* 氨基酸序列进行同源比对和进化树分析, 结果显示, 大黄鱼 *cGPDH* 氨基酸序列包含一个典型的保守特征性序列 GXGXXG, 并含有 10 个高度保守的半胱氨酸残基(Cys7、Cys102、Cys162、Cys200、Cys214、Cys243、Cys256、Cys265、

Cys329、Cys341)。*cGPDH* 在硬骨鱼类中的保守性较高(84.24%~99.14%), 大黄鱼 *cGPDH* 与棘头梅童鱼相似性最高, 为 99.14%, 与两栖类、鸟类、哺乳类的相似性较低(图 3, 图 4)。此外, 大黄鱼 *cGPDH* 与其他硬骨鱼类聚为一枝, 其他脊椎动物聚为另一枝(图 4)。



图 3 大黄鱼 *cGPDH* 与其他物种 *cGPDH* 氨基酸同源性比对

黑色区域为完全相似; 灰色区域为 75% 相似; 黑色框为保守的 GXGXXG 特征序列; * 表示半胱氨酸残基。

Fig. 3 *Larimichthys crocea* *cGPDH* homology comparison with other species *cGPDH* amino acids
The black area indicates completely similar; the gray area indicates 75% similar; the black frames indicates GXGXXG motif; * represents the phosphorylation site of protein C.

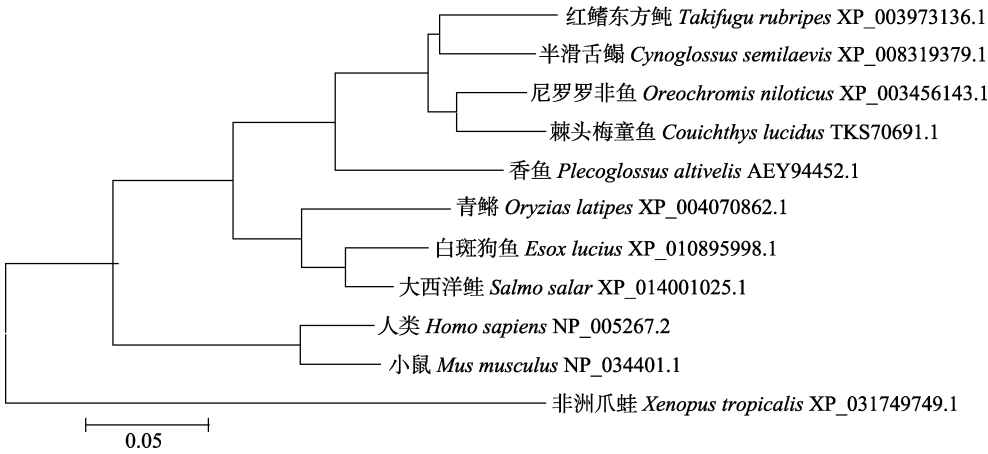


图 4 不同物种 *cGPDH* 氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the alignment of amino acid sequences of *cGPDH*

将大黄鱼 *mGPDH* 氨基酸序列与棘头梅童鱼 (TKS66450.1)、青鳉 (*Oryzias latipes* XP_020563241.1)、红鳍东方鲀 (XP_029696176.1)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus* XP_005452335.2)、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis* XP_008323276.1)、斑

马鱼 (NP_001038813.1)、雀鳝 (XP_015214294.1)、非洲爪蛙 (NP_001107700.1)、卡氏小鼠 (*Mus caroli* XP_029326597.1)、人类 (XP_024308566.1)、野牦牛 (*Bos mutus* ELR48610.1) 的 *mGPDH* 氨基酸序列进行同源比对和进化树分析, 结果显示, 大黄鱼

mGPDH 氨基酸序列中包含 5 个高度保守的半胱氨酸残基(Cys191、Cys273、Cys288、Cys312、Cys549), mGPDH 在硬骨鱼类中的保守性较高(88.63%~95.07%), 大黄鱼 mGPDH 与棘头梅童鱼

相似性最高, 为 95.07%, 与两栖类、鸟类、哺乳类的相似性较低(图 5, 图 6); 此外, 大黄鱼 mGPDH 与其他硬骨鱼类聚为一枝, 其他脊椎动物聚为另一枝(图 6)。

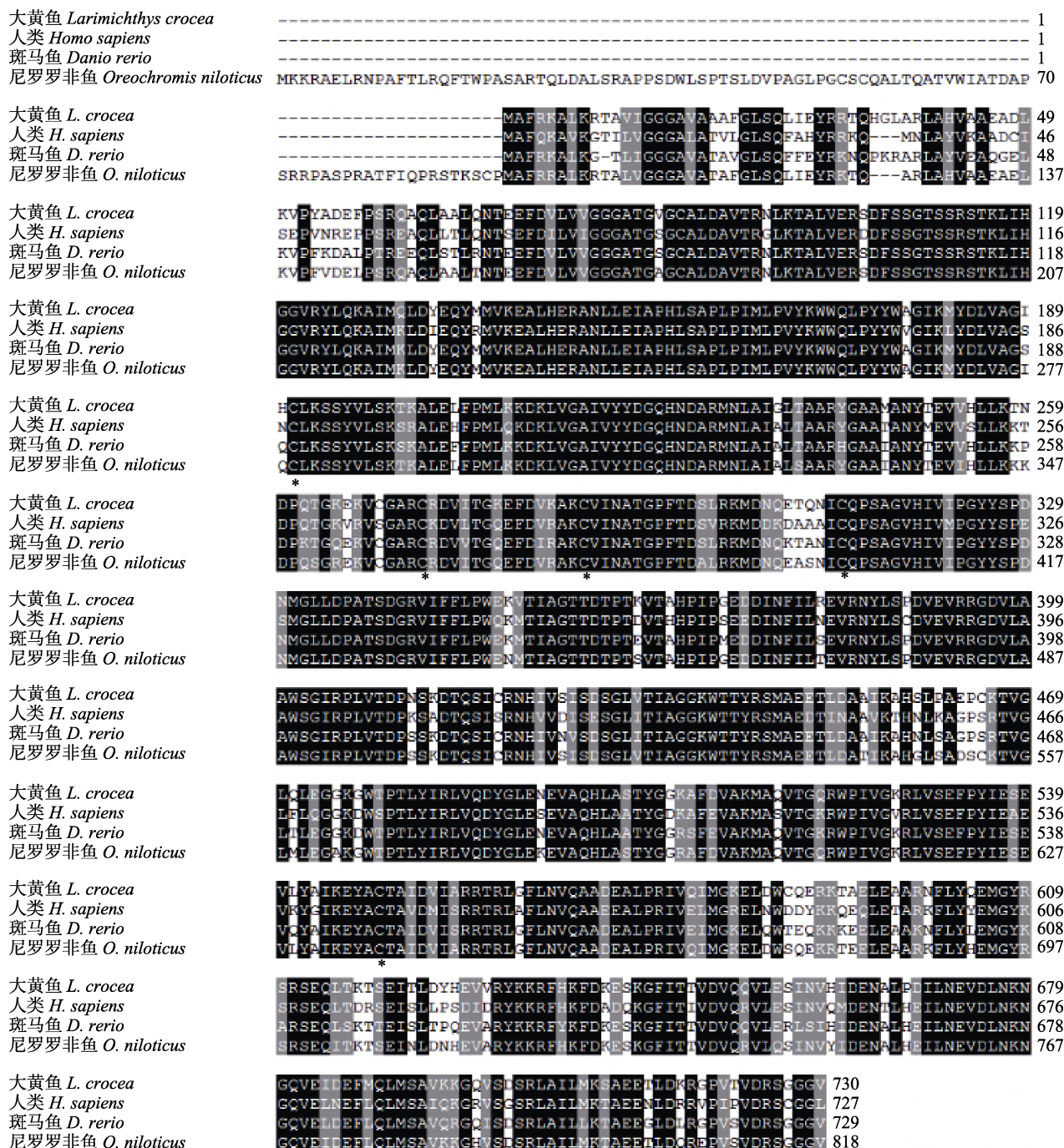


图 5 大黄鱼 mGPDH 与其他鱼类物种氨基酸同源性比对

黑色区域为完全相似, 灰色区域为 75% 相似, * 为保守的半胱氨酸残基。

Fig. 5 *Larimichthys crocea* cGPDH homology comparison with other species mGPDH amino acids

The black area indicates completely similar; the gray area indicates 75% similar;

* represents the phosphorylation site of protein C.

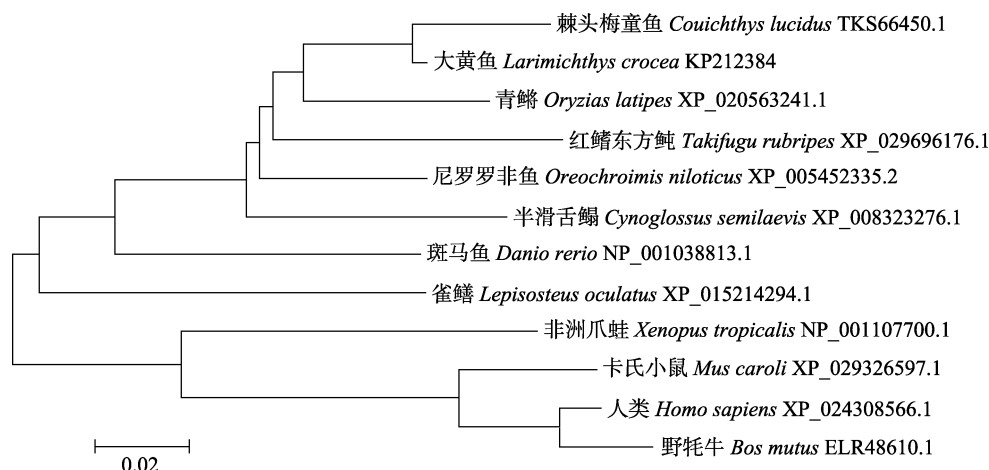


图 6 不同物种 mGPDH 氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on the alignment of amino acid sequences of mGPDH

2.3 大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* 理化性质和三维结构分析

ProtParam 分析结果显示 *cGPDH* 分子式为 $C_{1698}H_{2731}N_{449}O_{505}S_{19}$, 氨基酸序列中带正电荷的精氨酸(Arg)和赖氨酸(Lys)共 43 个, 带负电荷的天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)共 38 个, 不稳定指数为 22.78, 为稳定性蛋白。结合 ProtScale 分析, *cGPDH* 脂肪族指数为 96.05, 疏水性最强出现在 Leu89 处, 其值为 2.389, 疏水性最弱出现在 Glu59 处, 其值为 -2.1, 大部分氨基酸出现正值, 推测 *cGPDH* 为疏水性蛋白。TMHMM 分析蛋白跨膜结构域, *cGPDH* 蛋白不含跨膜结构域, 不属于分泌蛋白和跨膜蛋白。Protcomp 9.0 蛋白亚细胞定位分析显示, *cGPDH* 位于细胞质的可能性最大, 其值为 5.88, 其次为细胞膜, 其值为 0.18。利用 Net NGlyc 1.0 Serve 和 NetOGlyc 4.0 Server 分析糖基化位点, 发现 *cGPDH* 有 1 个 *N*-糖基化位点(Asn173), 1 个 *O*-糖基化位点(Ser281); 采用 NetPhos 3.1 Server 分析磷酸化位点, *cGPDH* 有 27 个磷酸化位点, 其中丝氨酸 12 个(第 16、29、117、133、145、194、246、249、255、281、283、和 323 位氨基酸残基), 苏氨酸 11 个(第 51、56、113、164、165、183、189、250、280、285 和 302 位氨基酸残基), 酪氨酸 4 个(第 41、63、307 和 326 位氨基酸残基)。

对于 *mGPDH*, ProtParam 分析结果显示 *cGPDH* 分子式为 $C_{3598}H_{5728}N_{990}O_{1071}S_{28}$, 氨基酸序列中带正电荷的精氨酸(Arg)和赖氨酸(Lys)共 88 个, 带

负电荷的天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)共 86 个, 不稳定指数为 38.77, 为稳定性蛋白。结合 ProtScale 分析, *cGPDH* 脂肪族指数为 91.26, 疏水性最强出现在 Ala20 处, 其值为 1.911, 疏水性最弱出现在 Asn305 处, 其值为 2.744, 大部分氨基酸出现负值, 推测 *mGPDH* 为亲水性蛋白。TMHMM 分析蛋白跨膜结构域, *mGPDH* 蛋白不含跨膜结构域, 不属于分泌蛋白和跨膜蛋白。Protcomp9.0 蛋白亚细胞定位分析显示, *mGPDH* 位于线粒体的可能性最大, 其值为 5.32, 其次为内质网, 其值为 0.24。利用 Net NGlyc 1.0 Server 和 NetOGlyc 4.0 Server 分析糖基化位点, 发现 *mGPDH* 有 1 个 *N*-糖基化位点(Asn248), 9 个 *O*-糖基化位点(Ser59、Thr358、Thr362、Thr365、Thr481、Ser610、Ser612、Thr616、Thr618、Ser619); 采用 NetPhos 3.1 Server 分析磷酸化位点, *mGPDH* 有 61 个磷酸化位点, 其中丝氨酸 28 个(第 104、107、108、111、114、194、195、199、299、327、339、387、402、418、426、428、445、459、502、531、538、610、612、619、642、692、700、702、710 位氨基酸残基), 苏氨酸 26 个(第 10、33、110、115、238、258、263、278、308、358、360、365、409、441、442、450、479、481、503、559、616、622、647、648、714、722 位氨基酸残基), 酪氨酸 7 个(第 137、196、443、535、542、603、625 位氨基酸残基)。

利用 SOPMA 对蛋白质二级结构进行分析, *cGPDH* 蛋白质二级结构中 α -螺旋(alpha helix, h)

占 47.85%, β -转角(beta turn, t)占 6.30%, 延伸链(extended strand, e)占 13.75%, 无规则卷曲(random coil, c)占 32.09%。蛋白质整体结构 α -螺旋为主要结构元件, 其次为无规则卷曲, β -转角较少。mGPDH 蛋白二级结构, α -螺旋占 49.59%, β -转角占 6.16%, 延伸链占 11.64%, 无规则卷曲占 32.60%; 蛋白质整体结构以 α -螺旋为主, 其次为无规则卷曲。SWISS-MODEL 预测三维结构显示(图 7a), cGPDH 和 mGPDH 蛋白均以 α -螺旋结构为主, cGPDH 预测 QMEAN 值为-0.66, 包含一个 C 端 α 螺旋底物结合结构, 一个 N 端 8 个 β 折叠结构和一个单体

结构。mGPDH 预测 QMEAN 值为-2.91, 目前对于 mGPDH 三维结构解析并不是很清晰(图 7b)。

2.4 大黄鱼 cGPDH 和 mGPDH mRNA 的组织表达分析

采用 qRT-PCR 检测 12 个组织中 cGPDH 和 mGPDH mRNA 的表达水平, 结果显示, cGPDH 和 mGPDH mRNA 在各个组织中均有表达。cGPDH 在血液中表达量最高, 其次在鳃、头肾和肠道也有较高表达, 肌肉表达量最低(图 8a)。mGPDH 在头肾表达量最高, 其次在血液、体肾、胃部; 肌肉表达量最低(图 8b)。

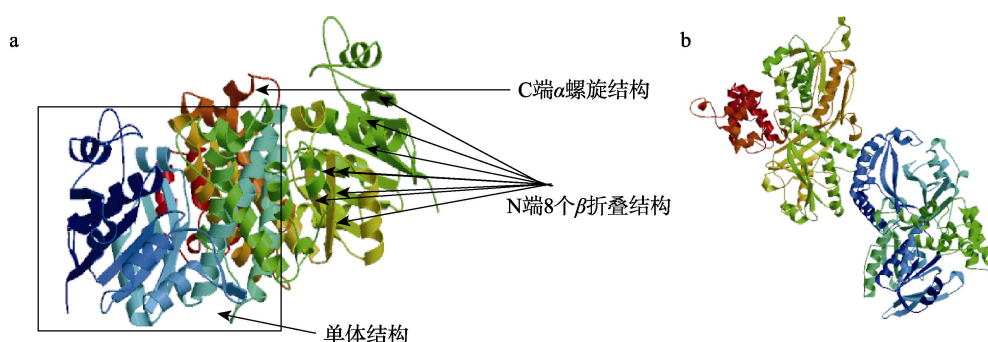


图 7 cGPDH (a)和 mGPDH (b)蛋白分子的空间结构

Fig. 7 The spatial structure of cGPDH (a) and mGPDH (b) predicted by SWISS-MODEL

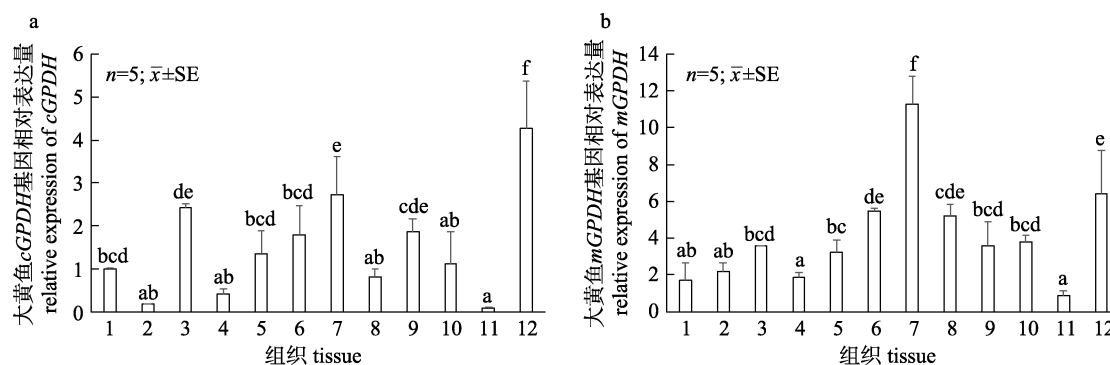


图 8 大黄鱼各组织中 cGPDH (a)和 mGPDH (b)mRNA 的相对表达量

1. 脑; 2. 心脏; 3. 鳃; 4. 肝; 5. 脾脏; 6. 肾脏; 7. 头肾; 8. 胃; 9. 肠道; 10. 皮肤; 11. 肌肉; 12. 血液。

不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 8 Relative expression of cGPDH (a) and mGPDH (b) mRNA in different tissues of *Larimichthys crocea*

1. brain; 2. heart; 3. gill; 4. liver; 5. spleen; 6. kidney; 7. head kidney; 8. stomach; 9. intestine; 10. skin; 11. muscle; 12. blood.

Different letters mean significant differences ($P<0.05$).

2.5 大黄鱼 cGPDH 和 mGPDH mRNA 在低温刺激下表达量变化

为了理解大黄鱼对低温胁迫的响应, 实验采用 qRT-PCR 检测低温胁迫后大黄鱼脑和肌肉

cGPDH 和 mGPDH mRNA 表达量的变化。实验期间, 从 15 °C 至 9 °C, cGPDH 在脑组织表达量没有明显变化(图 9a); 当温度降至 7 °C 时, cGPDH 表达量迅速增加, 7 °C 三个时间点 cGPDH 表达量

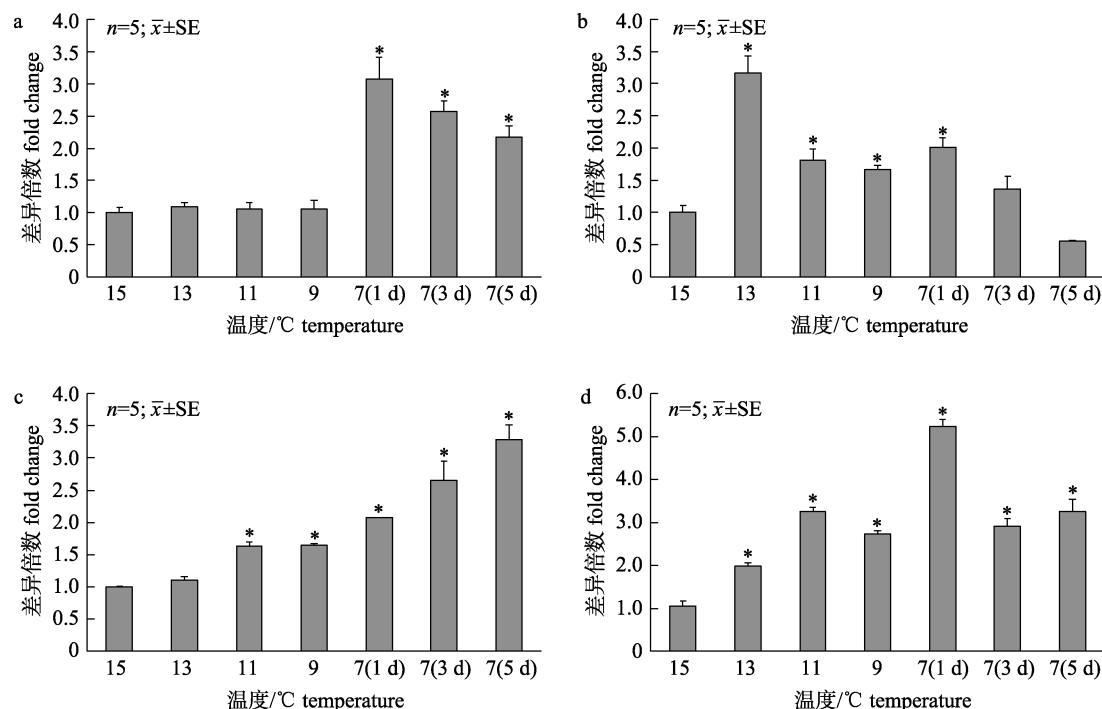


图9 低温胁迫下大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* 基因的表达分析

cGPDH 脑; (b) *cGPDH* 肌肉; (c) *mGPDH* 脑; (d) *mGPDH* 肌肉; *表示显著上升, $P < 0.05$ 。

Fig. 9 *cGPDH* and *mGPDH* expression of *Larimichthys crocea* under low temperature adaption

(a) *cGPDH* brain, (b) *cGPDH* muscle, (c) *mGPDH* brain, (d) *mGPDH* muscle; * and ! indicate significant up-regulation, $P < 0.05$.

为对照组的 3.07 倍、2.58 倍、2.17 倍。在肌肉组织(图 9b), *cGPDH* 表达量在开始降温的 13 °C 表达量迅速增加, 随后表达量有所下调, 但在 11 °C、9 °C 和 7 °C (1 d) 温度点, *cGPDH* 表达量仍比对照组高。*mGPDH* mRNA 在脑组织表达量从 13 °C 逐步上升(图 9c), 7 °C (5 d) 表达量达到最高值, 为对照组的 3.29 倍。在肌肉组织(图 9d), *mGPDH* mRNA 表达量也为上调趋势, 7 °C (1 d) 表达量达到峰值, 为对照组的 5.23 倍。

3 讨论

GPDH 是糖酵解、氧化磷酸化和脂肪代谢的关键酶, 代谢过程产生的 ATP、酮体和甘油等物质和能量有助于机体适应恶劣环境以确保存活。本研究克隆了大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* 基因全长序列, 分析 *cGPDH* 和 *mGPDH* 氨基酸序列, *cGPDH* 和 *mGPDH* 除具有家族保守序列外, *cGPDH* 氨基酸序列包含一个 GXGXXG 特征序列, 这段序列存在于所有 NAD 依赖性 GPDH 蛋白; *mGPDH* 含有 2 个 EF-hand 功能结构域, 表明该蛋

白具有结合 Ca^{2+} 的特性。有研究表明 *mGPDH* 活性依赖于 Ca^{2+} 的浓度, *mGPDH* 活性是被 Ca^{2+} 别构作用激活的^[13-14]。不同物种氨基酸比对分析发现大黄鱼 *cGPDH* 氨基酸序列含有 10 个高度保守的半胱氨酸残基, *mGPDH* 含有 5 个半胱氨酸残基, 这对蛋白质结构的稳定性和生物学功能非常重要。三维结构分析发现 *cGPDH* 含有 8 个 β 折叠结构, 包括 6 个平行的 β 折叠结构和 2 个反平行 β 折叠结构, 这些 β 折叠结构通过几个 α 螺旋结构连接在一起形成一个稳定的整体结构^[15]。系统进化树显示, 大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* 与其他硬骨鱼类聚在一起, 其他动物聚在一起, 表明鱼类 *cGPDH* 和 *mGPDH* 的分化是发生在类群的分化之后。此外, 有些植物, 如杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)^[16]、玉米(*Zea mays* L.)^[17], 其 *cGPDH* 存在多个亚型, 可能是基因组复制的原因。

大黄鱼 *cGPDH* mRNA 主要表达在血液, 其次是肾脏, 较少表达在肌肉, 这与人类主要表达在骨骼肌和脂肪组织完全不同^[18-19]。此外, 有报道大西洋鲑、虹鳟和香鱼(*Plecoglossus altivelis*)

cGPDH mRNA 主要表达在肝脏, 在脾脏表达较低^[3,20]。理氏裂腹鱼(*Schizothorax richardsonii*) *cGPDH* 也主要表达在肌肉和肝脏^[21]。昆虫 *cGPDH* 涉及能量代谢, 主要表达在飞行肌肉组织中^[4-5]。地松鼠(*Uroditellus richardsonii*)肝脏可以纯化得到 *cGPDH*^[22]。大黄鱼 *mGPDH* mRNA 主要表达在头肾, 肌肉表达量较低, 这与哺乳动物的研究结果有所不同, 小鼠 *mGPDH* mRNA 主要在棕色脂肪、肌肉和脑部表达, 在肝和心表达较低^[2]; 兔骨骼肌和脑可以分离纯化得到 *mGPDH*^[23-24]。这些不一致的结果可能由于物种的差异性以及物种适应不同环境而导致的不同表达分布。此外, 其他动物并未检测血液中 *GPDH* mRNA 含量, 且实验方法的不同, 检测季节的不同也可能导致不同的实验结果。

鱼类为了适应冬季低水温必须改变生理过程, 大多数鱼类通过积累甘油或抗冻蛋白降低冰点越冬。甘油是一种相容的溶质, 可以降低冰点而不引起任何的生理波动。Albertyn 等^[25]和 He 等^[26]研究报道酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)过表达 *cGPDH* 可导致其甘油产量显著增加, 相反沉默 *cGPDH* 导致甘油产量显著降低。RNA 干扰甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*) *cGPDH* 表达, 明显抑制了其血淋巴中甘油的积累^[27]。Ribunson 等^[28]研究发现虹香鱼(*Osmerus mordax*)冷驯化组的甘油浓度是暖驯化组的 100 倍。休眠期的跳鼠(*Jaculus orientalis*) *cGPDH* 活性在所有组织都有所增加, 在骨骼肌和棕色脂肪增加 3 倍^[29], 因此, *GPDH* 可能与生物体抗低温密切相关。Vanga Ewart 等^[3]研究报道虹香鱼在低温胁迫下 *cGPDH* 表达量显著增加, 这与虹香鱼体内甘油低温积累的结论一致, 进一步表明鱼类 *cGPDH* 具有抗低温的作用。Robinson 等^[28]和 Liebscher 等^[30]也证实了虹香鱼 *cGPDH* 表达量随季节发生波动, 冬季表达量最高。Barat 等^[21]研究发现理氏裂腹鱼肝脏 *cGPDH* 在水温 5 °C 的表达量相对 15 °C 增加 19 倍。冷胁迫下, 大黄鱼 *cGPDH* 和 *mGPDH* mRNA 表达量显著上调, 7 °C, 在脑部的增加量尤为显著(图 9a, 图 9c), 这与机体在胁迫环境下首先保证生命体征是一致的, 研

究结果也提示 *cGPDH* 和 *mGPDH* 可能参与大黄鱼低温适应调控, 但 7 °C (5 d)时, *cGPDH* mRNA 在肌肉组织表达量显著下调, 其可能是由于持续低温超过了大黄鱼生理调节范围, 在实际生产过程中水温持续 7 °C 将会导致大黄鱼大批量死亡。

参考文献:

- [1] Mydy L S, Cristobal J R, Katigbak R D, et al. Human glycerol 3-phosphate dehydrogenase: X-ray crystal structures that guide the interpretation of mutagenesis studies[J]. *Biochemistry*, 2019, 58(8): 1061-1073.
- [2] Mráček T, Drahota Z, Houštěk J. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2013, 1827(3): 401-410.
- [3] Vanya Ewart K, Richards R C, Driedzic W R. Cloning of glycerol-3-phosphate dehydrogenase cDNAs from two fish species and effect of temperature on enzyme expression in rainbow smelt (*Osmerus mordax*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 128(3): 401-412.
- [4] Fink S C, Brosemer R W. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase from the honey bee[J]. *Methods in Enzymology*, 1975, 41: 240-245.
- [5] Masson S W C, Hedges C P, Devaux J B L, et al. Mitochondrial glycerol 3-phosphate facilitates bumblebee pre-flight thermogenesis[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 13107.
- [6] Stroppa M M, Lagunas M S, Carriazo C S, et al. Differential expression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase isoforms in flight muscles of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae)[J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2013, 88(6): 1146-1151.
- [7] Wang X X, Huang M, Wang Y Z. The effect of insulin, TNF α and DHA on the proliferation, differentiation and lipolysis of preadipocytes isolated from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.)[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e48069.
- [8] Beiting T L, Bennett W A, McCauley R W. Temperature tolerances of north American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2000, 58(3): 237-275.
- [9] Qi Z H, Liu Y F, Luo S W, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of tumor suppressor protein p53 from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* in response to temperature stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(5): 1466-1476.
- [10] Mininni A N, Milan M, Ferrarresso S, et al. Liver transcriptome analysis in gilthead sea bream upon exposure to low

- temperature[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 765-777.
- [11] Li W Y, Luo H Z, Yin X L, et al. Effects of low temperature stress on the gene expression of MT, AQP1 and TCP1 of low temperature-resistant and non-low temperature resistant strains *Larimichthys crocea*[J/OL]. Journal of Dalian Ocean University. (2020-07-27). <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2020-042>. [李伟业, 罗海忠, 殷小龙, 等. 低温胁迫对耐低温和非耐低温品系大黄鱼 *MT*、*AQP1*、*TCP1* 基因表达的影响[J/OL]. 大连海洋大学学报. (2020-07-27). <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2020-042>.]
- [12] Miao L, Li M Y, Chen Y Y, et al. Cloning of cold inducible RNA-binding protein (CIRP) gene in *Larimichthys crocea* and its expression analysis under cold treatments[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(4): 481-489. [苗亮, 李明月, 陈莹莹, 等. 大黄鱼冷诱导结合蛋白(CIRP)基因 cDNA 克隆及低温胁迫对其时空表达的影响[J]. 水产学报, 2017, 41(4): 481-489.]
- [13] MacDonald M J, Brown L J. Calcium activation of mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase restudied[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996, 326(1): 79-84.
- [14] Carmon A, MacIntyre R. The alpha glycerophosphate cycle in *Drosophila melanogaster* VI. structure and evolution of enzyme paralogs in the genus *Drosophila*[J]. The Journal of Heredity, 2010, 101(2): 225-234.
- [15] de la Roche M, Tessier S N, Storey K B. Structural and functional properties of glycerol-3-phosphate dehydrogenase from a mammalian hibernator[J]. The Protein Journal, 2012, 31(2): 109-119.
- [16] Wu Q, Lan Y H, Cao X Y, et al. Characterization and diverse evolution patterns of glycerol-3-phosphate dehydrogenase family genes in *Dunaliella salina*[J]. Gene, 2019, 710: 161-169.
- [17] Zhao Y, Li X, Wang F, et al. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) gene family in *Zea mays* L.: Identification, subcellular localization, and transcriptional responses to abiotic stresses[J]. PLoS One, 2018, 13(7): e0200357.
- [18] Birkenmeier E H, Hoppe P C, Lyford K A, et al. Tissue- and cell-specific expression of human sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase in transgenic mice[J]. Nucleic Acids Research, 1992, 20(11): 2819-2825.
- [19] Sledzinski T, Korczynska J, Goyke E, et al. Association between cytosolic glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene expression in human subcutaneous adipose tissue and BMI[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2013, 32(2): 300-309.
- [20] Hao X N, Chen J, Lu X J, et al. cDNA cloning and mRNA expression of GPDH in Ayu (*Plecoglossus altivelis*)[J]. Biotechnology Bulletin, 2011(2): 151-156. [郝晓娜, 陈炯, 陆新江, 等. 香鱼甘油-3-磷酸脱氢酶基因的克隆与表达[J]. 生物技术通报, 2011(2): 151-156.]
- [21] Barat A, Goel C, Tyagi, A, et al. Molecular cloning and expression profile of snow trout GPDH gene in response to abiotic stress[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(12): 10843-10849.
- [22] Ruberto A A, Childers C L, Storey K B. Purification and properties of glycerol-3-phosphate dehydrogenase from the liver of the hibernating ground squirrel, *Urocyon richardsonii*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2016, 202: 48-55.
- [23] Cole E S, Lepp C A, Holohan P D, et al. Isolation and characterization of flavin-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase from rabbit skeletal muscle mitochondria and comparison with the enzyme from rabbit brain[J]. Journal of Biological Chemistry, 1978, 253(21): 7952-7959.
- [24] Wernette M E, Ochs R S, Lardy H A. Ca^{2+} stimulation of rat liver mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1981, 256(24): 12767-12771.
- [25] Albertyn J, Hohmann S, Thevelein J M, et al. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae* and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway[J]. Molecular and Cellular Biology, 1994, 14(6): 4135-4144.
- [26] He W J, Ye S C, Xue T, et al. Silencing the glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in more ethanol being produced and less glycerol[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(3): 523-529.
- [27] Park Y, Kim Y. RNA interference of glycerol biosynthesis suppresses rapid cold hardening of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*[J]. The Journal of Experimental Biology, 2013, 216(Pt 22): 4196-4203.
- [28] Robinson J L, Hall J R, Charman M, et al. Molecular analysis, tissue profiles, and seasonal patterns of cytosolic and mitochondrial GPDH in freeze-resistant rainbow smelt (*Osmerus mordax*)[J]. Physiological and Biochemical Zoology, 2011, 84(4): 363-376.
- [29] Berrada W, Naya A, Iddar A, et al. Purification and characterization of cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase from skeletal muscle of jerboa (*Jaculus orientalis*)[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2002, 231(1-2): 117-127.
- [30] Liebscher R S, Richards R C, Lewis J M, et al. Seasonal freeze resistance of rainbow smelt (*Osmerus mordax*) is generated by differential expression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and anti-freeze protein genes[J]. Physiological and Biochemical Zoology, 2006, 79(2): 411-423.

Molecular cloning of *cGPDH* and *mGPDH* and their expression analysis under low-temperature stress in *Larimichthys crocea*

ZHANG Dongling, XU Hao, ZHANG Zhenxi, WANG Zhiyong

Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China

Abstract: For poikilotherms, including fish, water temperature is one of the most important environmental factors, as it affects their physiological and metabolic activities. Fish can adapt to daily or seasonal temperature fluctuations by reorganizing their physiological processes. However, when fish reach or exceed their limits for cold tolerance, they are no longer able to physiologically adapt to cope with the environmental conditions, and thus their health and survival are threatened. To survive in cold water environments, fish can produce anti-freeze proteins or accumulate glycerol, which can effectively depress the freezing point. Large yellow croakers, *Larimichthys crocea*, a warm water and near-shore migratory fish, increasingly suffer from cold temperatures during winter due to changes in the global climate. As such, there is an urgent need for both the scientific community and the fishery industry to investigate the molecular mechanisms underlying cold tolerance in this species. In this study, the full-length cDNA sequences of the cGPDH and mGPDH genes of large yellow croakers were cloned by rapid amplification of cDNA ends polymerase chain reaction (RACE PCR). The full-length cDNA sequences of cGPDH and mGPDH were 1050 bp and 2193 bp, consisted of open reading frames of 1050 bp and 2193 bp, and encoded 349 amino acids and 730 amino acids, respectively. Based on amino similarity comparison, cGPDH and mGPDH were found to have high homology with other teleost fishes. cGPDH was found to have a conserved GXGXXG motif, and mGPDH was found to have two EF-hand functional domains. Phylogenetic tree analysis indicated that cGPDH and mGPDH of large yellow croakers are associated with those in other fish and have the highest similarity with those of big head croakers, *Collichthys lucidus*. Bioinformatics analysis indicates that cGPDH and mGPDH did not contain transmembrane domains. cGPDH subcellular localization was most likely in cytoplasm. The three-dimensional structure contained a C-terminal α -helix substrate-binding structure, eight N-terminal β -fold structures, and a monomer structure. In contrast, mGPDH was most likely to be located in the mitochondria. In our experiments, we lowered the water temperature experienced by large yellow croakers from 15 °C (ambient temperature) to 9 °C (2 °C/day). We subsequently lowered the temperature from 9 °C to 7 °C (1 °C/day) and maintained the temperature at 7 °C for five days. We found that there were significant differences in cGPDH and mGPDH mRNA expression in experimental treatments compared to those in the controls. We found that the expression of cGPDH and mGPDH mRNA tended to be up-regulated in the brain and liver when fish were exposed to lower temperatures. However, the expression of cGPDH in the brain and liver sharply decreased at 7 °C. These results suggest that cGPDH and mGPDH may be involved in the mechanisms underlying adaptations to low temperatures in marine fish, including in large yellow croakers.

Key words: *Larimichthys crocea*; *cGPDH*; *mGPDH*; low temperature; gene regulation; gene expression

Corresponding author: WANG Zhiyong. E-mail: zywang@jmu.edu.cn