

DOI: 10.12264/JFSC2021-0020

## 翘嘴鲌学习记忆相关基因 *c-fos* 对食欲基因的调控

梁慧<sup>1,2</sup>, 何珊<sup>1,2</sup>, 梁旭方<sup>2</sup>

1. 安徽省农业科学院水产研究所, 水产增养殖安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230031;

2. 华中农业大学水产学院, 华中农业大学鳊鱼研究中心, 湖北 武汉 430070

**摘要:** 学习记忆在动物获得新的觅食技巧和食物偏好方面扮演着重要的角色。为评估学习记忆对翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)摄食调控的影响, 构建翘嘴鲌学习记忆相关基因 *c-fos* 及 *zif268* 荧光过表达载体, 并以 pcDNA3.1-EGFP 载体质粒中的绿色荧光蛋白基因为报道基因进行电转实验, 优化电压、脉冲时间、质粒浓度和电击次数等电转条件, 确立最佳条件。利用电击的方式转染翘嘴鲌脑细胞, 检测食欲基因 *mch*、*agrp*、*pomc*、*npv* 表达变化。结果显示, 成功构建了学习记忆过表达载体 pcDNA3.1-*c-fos*-EGFP、pcDNA3.1-*zif268*-EGFP。翘嘴鲌脑细胞电转染的最适条件: 细胞密度  $1 \times 10^6/\text{mL}$ 、电压 240 V、脉冲时间 5 ms、质粒 6  $\mu\text{g}$ 、电击 1 次、转染 48 h, 可见大部分荧光蛋白表达, 转染率较高, 表明 pcDNA3.1-EGFP 在体外成功转染翘嘴鲌脑细胞。过表达 *c-fos* 基因后, 食欲相关基因 *pomc* 和 *npv* mRNA 水平均显著上升。而过表达 *zif268* 基因后, 并未发现食欲基因有差异表达。以上结果说明, 翘嘴鲌学习记忆相关基因 *c-fos* 的表达影响了食欲相关基因 *pomc* 和 *npv* 的表达。

**关键词:** 翘嘴鲌; 过表达; 电转染; *c-fos*; *pomc*; *npv*

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2021)09–1118–11

学习记忆是动物通过互动获得新技能和信息, 或观察其他个体自己获取信息的过程。其中最重要的包括获得新的觅食技能<sup>[1]</sup>和食物偏好<sup>[2–4]</sup>。动物的学习记忆过程与其控制能量平衡的神经以及生理基础之间存在着非常密切的关系, 各种内分泌信号可作用于脑内的神经元, 以此来调节食物的摄入量和体重<sup>[5]</sup>。尽管学习记忆主要是在哺乳动物和鸟类中进行研究<sup>[6]</sup>, 但最近的研究报道, 鱼类的各种行为活动都受到学习记忆的影响<sup>[7]</sup>。由于觅食环境的复杂性和食物的变化性, 学习和记忆在鱼类觅食中起着非常重要的作用<sup>[8]</sup>。最近的几项研究表明, 在几种鱼类中的研究都显示, 学习记忆加强了其觅食行为, 例如大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)<sup>[9]</sup>、孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)<sup>[10–11]</sup>和翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)<sup>[12]</sup>, 训练有素的大西洋鲑(*Salmo salar*)幼鱼接受猎物的概率大大提高<sup>[2]</sup>。而学习记

忆能否在鱼类食性转变如驯食等过程中发挥作用, 目前尚不明确。

作为学习记忆相关基因之一的原癌基因 *c-fos* (proto-oncogene *c-fos*), 其表达是小鼠海马区依赖性非空间记忆的形成和反复记忆所必需的<sup>[13]</sup>。研究指出早期生长反应因子 1 (early growth response 1, *egr1*, 也被称为 *zif268*)对记忆巩固和持久记忆起到重要作用。学习记忆基因 *Zif268* 敲除小鼠出现长期记忆受损, 但短期记忆仍保留正常功能<sup>[14]</sup>。研究报道食欲调控相关基因包括厌食神经肽 (pro-opiomelanocortin, *pomc*)、促食神经肽 Y (neuropeptide y, *npv*)、刺鼠色蛋白相关蛋白 (agouti related peptide, *agrp*)以及黑色素浓集激素 (melanin-concentrating hormone, *mch*)等<sup>[15–16]</sup>。摄食相关基因 *npv* 是大脑中最丰富的神经肽之一, 在能量平衡和食物摄入中发挥着重要的调节作用<sup>[17]</sup>。研究表

收稿日期: 2021-01-23; 修订日期: 2021-02-20.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31772822); 水产增养殖安徽省重点实验室开放课题项目(AHSC202002).

作者简介: 梁慧(1995–), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类营养与生理. E-mail: huiliang\_1995@163.com

通信作者: 何珊, 副教授, 研究方向为鱼类摄食代谢调控及饲料利用遗传改良. E-mail: heshan@mail.hzau.edu.cn

明 *agrp* 通过抑制 *pomc* 产生的抑食欲神经肽  $\alpha$ -黑素细胞刺激激素来增加食物的摄取<sup>[18]</sup>。*mch* 为室下丘脑外侧的环状氨基酸神经肽, 它被认为是摄食行为的重要调节剂。常规饮食的小鼠脑室注射 *mch* 后, 它的体重、脂肪和肝脏重量均显著增加<sup>[19]</sup>。研究显示野生鸡和驯化后的鸡(家养鸡)相比, 转化生长因子  $\beta$  受体 III (*transforming growth factor-bet a receptor III*, *TGFBR3*)基因表达发生了很大的变化<sup>[20]</sup>。然而, 学习记忆影响鱼类摄食及食性的过程中是否存在学习记忆相关基因 *c-fos*、*zif268* 对食欲相关基因 *mch*、*agrp*、*pomc*、*npv* 表达的调控, 仍不清楚。

翘嘴鳊属鲈形目(Perciformes)、真鲈科(Percichthyidae), 是中国特有的淡水鱼珍品。但其食性奇特, 自鱼苗开口起就以活鱼虾为食, 经过长期的驯化后才可以接受人工饲料<sup>[21]</sup>, 而长期驯化过程中的学习记忆促进了翘嘴鳊食性从活鱼转变为饲料<sup>[11]</sup>。He 等<sup>[22]</sup>对杂交鳊驯食性状的转录组进行分析发现, 学习通路中多个基因差异表达, 包括 *c-fos*、*zif268* 等; 食欲调控通路中多个基因差异表达, 包括 *agrp*、*pomc*、*mch*、*npv* 等。因此, 本实验以翘嘴鳊为研究对象, 研究学习记忆相关基因 *c-fos*、*zif268* 是否对食欲相关基因 *mch*、*agrp*、*pomc*、*npv* 的表达存在调控作用, 为进一步探讨学习记忆对鱼类摄食调控的分子机制, 并为改进翘嘴鳊人工饲料驯化技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用翘嘴鳊(体重 50 g 左右)取自华中农业大学鳊鱼研究中心, 用于后续分离翘嘴鳊脑细胞。实验开始之前先将翘嘴鳊转移到循环水养殖系统内暂养 1 周, 鱼缸水体体积为 100 L, 曝气水养殖, 水体 pH 维持在 6.8~7.2, 溶解氧含量维持在 6.8~7.8 mg/L, 每日正常投喂饵料鱼, 换水吸污, 以维持翘嘴鳊稳定正常生理状态。

主要试剂: pcDNA3.1-EGFP (Invitrogen 公司), Supercoiled DNA Ladder Marker (TaKaRa 公司), DL 2000 Marker (TaKaRa 公司), 胎牛血清(fatal bovine serum, FBS), 胰蛋白酶, L15 培养液(Genom

生物公司), I 型胶原酶(Gibco 公司), 两性霉素 B, 硫酸庆大霉素, 青链霉素双抗(HyClone 公司), DPBS, Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme 公司), 限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III (TaKaRa 公司), DH5 $\alpha$  感受态细胞(TaKaRa 公司), pEASY-Blunt Cloning Kit (北京全式金生物技术有限公司)。

1.2 构建学习记忆基因过表达载体

首先进行翘嘴鳊 *c-fos/zif268* 基因 CDS 全长扩增, 从本研究中心已有数据库中调取所需 *c-fos* 和 *zif268* 基因的 CDS 序列, 利用 Primer Premier5.0 软件设计扩增引物如表 1 所示, 由上海生工生物公司合成。以翘嘴鳊 cDNA 为模板, 使用高保真酶进行 PCR 扩增。胶回收纯化 PCR 产物, 平末端载体连接转化, 重组质粒阳性克隆鉴定, 提取质粒, 线性化克隆载体制备, 插入片段引物设计, 根据 *c-fos/zif268* 基因 CDS 序列, 设计重组引物如表 2 所示。后进行插入片段的 PCR 扩增, 目的基因与质粒的重组反应, 重组产物转化, 最后对重组产物克隆鉴定。使用 *Taq* DNA Polymerase 进行重组产物的阳性克隆鉴定, 选出长势良好的大肠杆菌单菌落, 以菌液为模板进行 PCR 扩增, 初步鉴定质粒是否为阳性, 重组产物是否转化成功。重组产物的 PCR 扩增反应体系为: Mix 20  $\mu$ L, M13-F 2  $\mu$ L, M13-R 2  $\mu$ L, 菌液 1  $\mu$ L。反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 10 s; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 32 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后取 2  $\mu$ L PCR 产物进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 检测目的条带大小正确, 筛选出阳性克隆菌液送生工测序, 进行序列分析, 测序成功后将菌液扩大培养, 用质粒提取试剂盒提取质粒 DNA。

表 1 翘嘴鳊 *c-fos/zif268* 基因 CDS 全长扩增引物  
Tab. 1 Primers for CDS full-length amplification of *c-fos/zif268* gene of *Siniperca chuatsi*

| 引物<br>primer     | 序列(5'-3')<br>sequence (5'-3') | 退火温度/ $^{\circ}$ C<br>annealing temperature |
|------------------|-------------------------------|---------------------------------------------|
| <i>c-fos</i> -F  | ATGTATCATAACAACCTGACG<br>ACTG | 58                                          |
| <i>c-fos</i> -R  | TTATAAGGCGAGGAGAGTTGGA        |                                             |
| <i>zif268</i> -F | ATGGCAGCGACCAAAGC             | 57                                          |
| <i>zif268</i> -R | TCAGCAGATGCTGGAGCTG           |                                             |

表 2 翘嘴鲌 *c-fos/zif268* 基因重组引物设计

Tab. 2 Recombinant primer of *c-fos/zif268* gene of *Siniperca chuatsi*

| 引物 primer                           | 序列(5'-3') sequence (5'-3')                               |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <i>c-fos</i> -F ( <i>Hind</i> III)  | CTAGCGTCTAAACTTA <b>AAGCTT</b> ATGTATCATAACAACCTGACGACTG |
| <i>c-fos</i> -R ( <i>Eco</i> R I)   | TGCTGGATATCTGCAGAA <b>TTCTT</b> ATAAGGCGAGGAGAGTTGGA     |
| <i>zif268</i> -F ( <i>Hind</i> III) | CTAGCGTCTAAACTTA <b>AAGCTT</b> ATGGCAGCGACCAAAGC         |
| <i>zif268</i> -R ( <i>Eco</i> R I)  | TGCTGGATATCTGCAGAA <b>TTCTT</b> CAGCAGATGCTGGAGCTG       |

注: 斜体加粗位置是酶切位点。  
Note: The position in bold italics is the restriction site.

1.3 分离翘嘴鲌脑细胞

选取 1 尾状态比较好的翘嘴鲌, 用 75% 的酒精消毒, 在超净工作台里剖取脑组织于 DPBS 中清洗, 用剪刀镊子去除多余的组织, 然后将脑组织放入盛有 AIM 液的培养皿内浸泡消毒 1.5 h; 吸掉培养皿中多余 AIM 液, 用剪刀将脑组织剪成 1 mm<sup>3</sup> 大小的组织块, 将组织块转移到盛有胶原酶消化液的离心管中, 在 28 ℃ 培养箱中消化 2 h; 加入 L15 培养液轻轻吹打得到脑细胞, 1000 r/min 室温离心 5 min 后弃上清, 随后再用 L15 培养液漂洗两次(1000 r/min, 室温离心 5 min); 最后将收集的脑细胞加入原代培养液重悬后接种到细胞培养瓶, 于 28 ℃ 无 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 第 4 天更换原代培养液 1 次。在显微镜下观察脑细胞的生长情况。本课题组已经采用 Neu-N 和 β-tubulin 免疫荧光细胞化学技术鉴定了脑细胞神经元纯度<sup>[23]</sup>。在脑原代细胞分离至第 3 代之后, 即进行实验。将脑细胞扩大培养, 铺板至 6 孔板中, 每个孔盛放 2.0 mL 培养液, 待细胞长满后进行下一步实验。

1.4 电转染翘嘴鲌脑细胞

取翘嘴鲌脑细胞传代到细胞平皿中, 细胞生长到对数期, 消化细胞, 收集后进行电转染。具体步骤如下: 将生长到对数期的脑细胞培养基吸走, DPBS 洗 1 遍, 加入胰酶消化, 全培养基中和胰酶反应; 取少量细胞悬液进行细胞计数, 取 1×10<sup>6</sup> 个细胞, 1000 r/min 离心 5 min; 弃上清, 加入 1 mL 培养基重悬细胞, 1000 r/min 离心 5 min; 弃上清, 按 1×10<sup>6</sup> 个细胞/20 μL Opti-mem 培养基加入 1 mL 培养基重悬细胞; 质粒/Opti-mem 培养基细胞重悬液加入, 准备电泳; 设置 BEX CUY21 EDIT 电转仪电转程序; 将混匀好的细胞和质粒加入到电转杯中, 将电击杯放入电击槽中, 脉冲电击; 将

细胞转移至已含 1 mL 培养基的 6 孔板中, 轻轻晃动孔板, 混匀细胞; 转染一定时间在倒置荧光显微镜下观察细胞转染情况, 并拍照记录。之后收集细胞, 冻存于-80 ℃超低温冰箱。

1.5 检测相关基因的 mRNA 表达水平

利用 TRIzol Reagent 试剂(TaKaRa)提取翘嘴鲌脑原代细胞的总 RNA, 再用 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR 逆转录试剂盒(诺唯赞)进行反转录得到 cDNA。采用实时荧光定量 RT-PCR 方法测定脑细胞中 *c-fos*、*zif268*、*mch*、*agrp*、*pomc*、*npv* 基因的 mRNA 表达水平。反应体系(20 μL)如下: SYBR Green Supermix 10 μL, F 0.4 μL, R 0.4 μL, cDNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.2 μL。反应程序如下: 95 ℃, 5 min; 95 ℃, 10 s; 退火温度 30 s, 延伸 30 s, 共 39 个循环。每经过一个循环, 收集一次荧光强度信号, 最后选用 *rpl13a* 这种从翘嘴鲌中筛选出来的内源性的管家基因来进行校正<sup>[11]</sup>, 使用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法<sup>[24]</sup>计算各基因的相对表达量, 每个样品重复 3 次。本研究所用到的荧光定量引物均采用 Primer Premier5.0 软件进行设计, 并由上海生工生物公司合成, 引物序列见表 3。

1.6 数据处理及统计分析

所有数据使用 SPSS 19.0 软件进行数据的统计学分析, 两组数据之间的比较采用独立样本 *T* 检验, *P*<0.05 为显著水平, *P*<0.01 为极显著水平, 结果均采用平均值±标准误( $\bar{x} \pm SE$ )表示。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增目的基因

设计特异性引物, 然后以翘嘴鲌脑组织总 RNA 为模板, 反转录后通过 PCR 扩增出目的片段, 琼脂糖凝胶电泳后, 获得 *zif268* 为 1416 bp, *c-fos*

表 3 荧光定量 PCR 所用引物序列和退火温度  
Tab. 3 Primer sequences and annealing temperatures used for RT-PCR

| 基因<br>gene name | 引物<br>primer     | 序列(5'-3')<br>sequence (5'-3') | 退火温度/℃<br>annealing temperature | 扩增效率/%<br>amplification efficiency |
|-----------------|------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| <i>npv</i>      | <i>npv</i> -F    | GTTGAAGGAAAGCACAGACA          | 52                              | 103.4                              |
|                 | <i>npv</i> -R    | GCTCATAGAGGTAAAAGGGG          |                                 |                                    |
| <i>agrp</i>     | <i>agrp</i> -F   | GTGCTGCTCTGCTGTTGG            | 65                              | 101.2                              |
|                 | <i>agrp</i> -R   | AGGTGTCACAGGGGTCGC            |                                 |                                    |
| <i>pomc</i>     | <i>pomc</i> -F   | GGCTGAAGATGGTGTGTCTATG        | 56                              | 95.4                               |
|                 | <i>pomc</i> -R   | ACATGCAGAGGTGAATACAGTC        |                                 |                                    |
| <i>rpl13a</i>   | <i>rpl13a</i> -F | TATCCCCCACCCTATGACA           | 59                              | 100.6                              |
|                 | <i>rpl13a</i> -R | ACGCCCAAGGAGAGCGAACT          |                                 |                                    |
| <i>mch</i>      | <i>mch</i> -F    | AAGAAACTCATCCACGAAG           | 52                              | 99.6                               |
|                 | <i>mch</i> -R    | GGTGAAAGTATCCTGTCTCC          |                                 |                                    |
| <i>c-fos</i>    | <i>c-fos</i> -F  | CCTGACGACTGACATGGATTC         | 56                              | 102.4                              |
|                 | <i>c-fos</i> -R  | GTTTCATTGGCTTGCTTGCTAC        |                                 |                                    |
| <i>zif268</i>   | <i>zif268</i> -F | GGATCTTGCCGTGCCTCTTG          | 60                              | 98.9                               |
|                 | <i>zif268</i> -R | CTGCGACCGCCGTTTCTC            |                                 |                                    |

为 1143 bp 的特异性条带, 结果与预期值大小一致(图 1)。经生工测序, blast 比对后同源性为 100%。

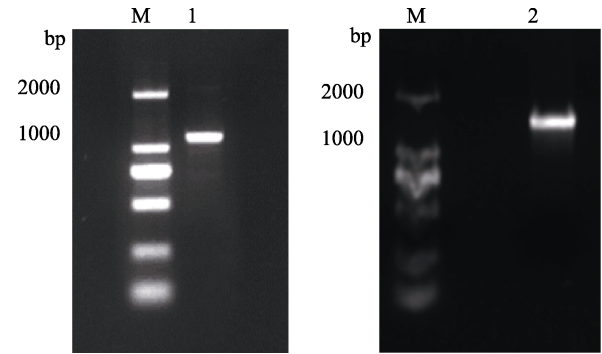


图 1 以翘嘴鳊脑组织总 RNA 为模板扩增目的基因的凝胶电泳检测图

1 号泳道是 *c-fos* 基因 CDS 序列扩增结果; 2 号泳道是 *zif268* 基因 CDS 序列扩增结果; M 泳道是 2000 bp Marker 条带。  
Fig. 1 Electrophoresis detection image of PCR amplification product for target gene in *Siniperca chuatsi* brain tissue total RNA Lane 1 is amplification of the *c-fos* gene CDS sequence; Lane 2 is amplification of the *zif268* gene CDS sequence; Lane M is 2000 bp marker band.

2.2 真核表达载体线性化

真核表达载体 pcDNA3.1-EGFP 用限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切, 载体由环状变为线状, 电泳结果如图 2 所示, 出现的电泳条带为线性化条带, 与预期结果相符。

2.3 重组质粒 pcDNA3.1-*c-fos/zif268*-EGFP 鉴定  
筛选出阳性克隆菌液送生工测序鉴定, 测序

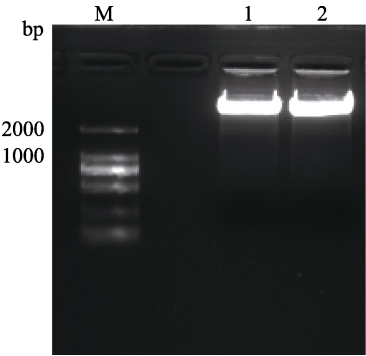


图 2 线性化质粒 pcDNA3.1-EGFP 凝胶电泳检测图  
1、2 号泳道是 pcDNA3.1-EGFP 质粒线性化后的条带; M 泳道是 marker 条带。

Fig. 2 Linearized plasmid pcDNA3.1-EGFP gel electrophoresis detection image  
Lanes 1 and 2 are the linearized bands of pcDNA3.1-EGFP plasmid; Lane M is the marker band.

结果与翘嘴鳊 *c-fos*、*zif268* 基因氨基酸序列进行比对, 与理论结果 100%相符。对含有重组质粒的菌液进行扩大培养, 提取重组质粒 pcDNA3.1-*c-fos/zif268*-EGFP, 质粒 1.2%琼脂糖凝胶电泳结果如图 3 所示, pcDNA3.1-EGFP 为 6148 bp, pcDNA3.1-*c-fos*-EGFP 为 7291 bp, pcDNA3.1- *zif268*- EGFP 为 7564 bp, 出现特异性电泳条带与预期结果相符。  
2.4 翘嘴鳊脑细胞电转染 pcDNA3.1-EGFP 质粒的条件

将 pcDNA3.1-EGFP 质粒用电转染的方法转入翘嘴鳊脑细胞, 首先是电压条件的确立(图 4):

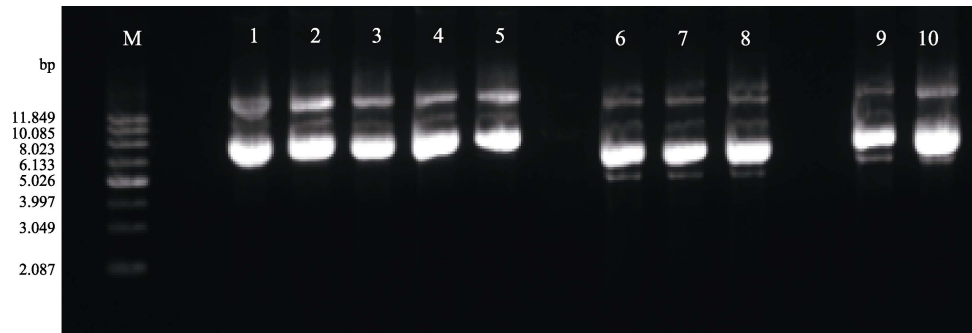


图 3 重组质粒 pcDNA3.1-EGFP、pcDNA3.1-*c-fos*-EGFP 和 pcDNA3.1-*zif268*-EGFP 的 PCR 凝胶电泳检测图  
M 泳道是 marker 条带; 1-5 泳道是 pcDNA3.1-*zif268*-EGFP; 6-8 泳道是 pcDNA3.1-EGFP; 9-10 泳道是 pcDNA3.1-*c-fos*-EGFP.

Fig. 3 PCR gel electrophoresis detection image of recombinant plasmid pcDNA3.1-EGFP、  
pcDNA3.1-*c-fos*-EGFP and pcDNA3.1-*zif268*-EGFP  
Lane M is the marker band; lanes 1-5 are pcDNA3.1-*zif268*-EGFP; lanes 6-8 are pcDNA3.1-EGFP;  
Lanes 9-10 are pcDNA3.1-*c-fos*-EGFP.

细胞密度  $1\times 10^6/\text{mL}$ , 脉冲时间 5 ms, pcDNA3.1-EGFP 质粒 4  $\mu\text{g}$ , 电击 1 次, 转染 48 h。图 4a~4e 设置电压依次为 180 V、200 V、220 V、240 V、260 V。研究发现电压在 240 V 条件下细胞形态正常, 转染效率最高。质粒浓度条件的确立(图 5): 细胞密度  $1\times 10^6/\text{mL}$ , 电压 240 V, 脉冲时间 5 ms, 电击 1 次, 转染 48 h。图 5a~5e 加入的质粒依次为 2  $\mu\text{g}$ 、4  $\mu\text{g}$ 、6  $\mu\text{g}$ 、8  $\mu\text{g}$ 、10  $\mu\text{g}$ 。研究发现加

入的质粒为 6  $\mu\text{g}$  时, 转染效率最高。电击次数的确立(图 6): 细胞密度  $1\times 10^6/\text{mL}$ , 电压 240 V, pcDNA3.1-EGFP 质粒 4  $\mu\text{g}$ , 脉冲时间 5 ms, 转染 48 h。图 6a~6c 电击的次数分别为 1、2、3 次。发现电击次数为 1 次时, 转染效率最高。转染时间的确立(图 7): 细胞密度  $1\times 10^6/\text{mL}$ 、电压 240 V、pcDNA3.1-EGFP 质粒 4  $\mu\text{g}$ 、脉冲时间 5 ms、电击 1 次。图 7a~7c 图转染的时间分别为 24 h、48 h、

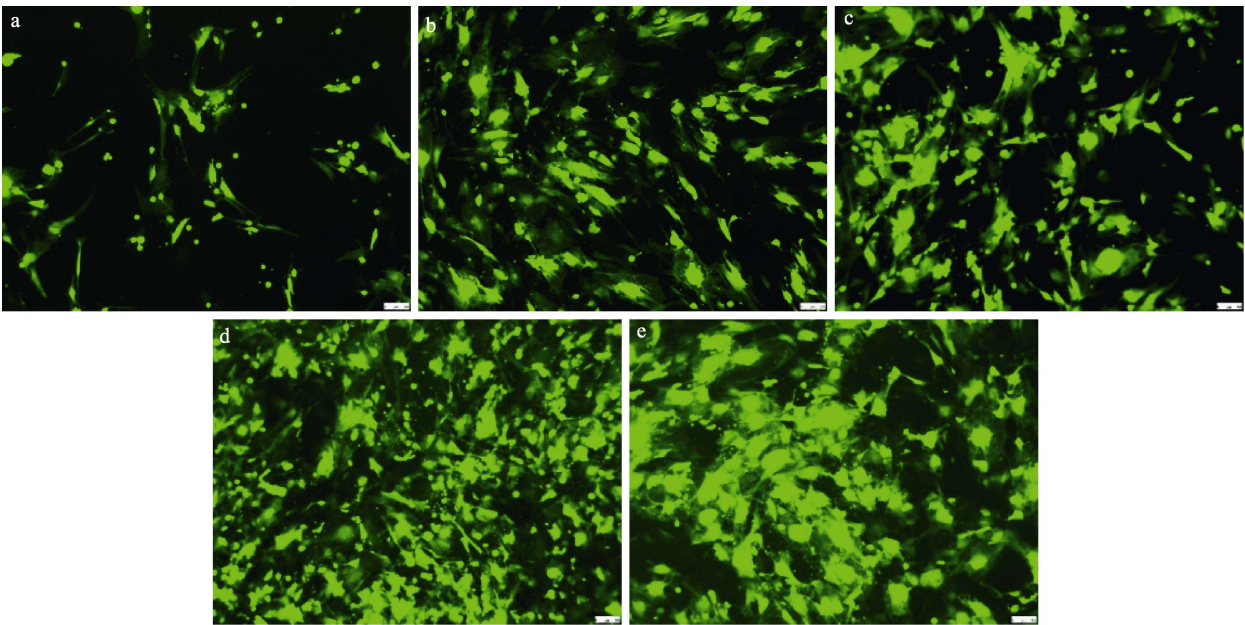


图 4 不同电压对翘嘴鲈脑细胞转染的影响( $\times 100$ )  
a. 180 V; b. 200 V; c. 220 V; d. 240 V; e. 260 V  
Fig. 4 Effect of different voltage on the transfection of *Siniperca chuatsi* cells ( $\times 100$ )  
a. 180 V; b. 200 V; c. 220 V; d. 240 V; e. 260 V



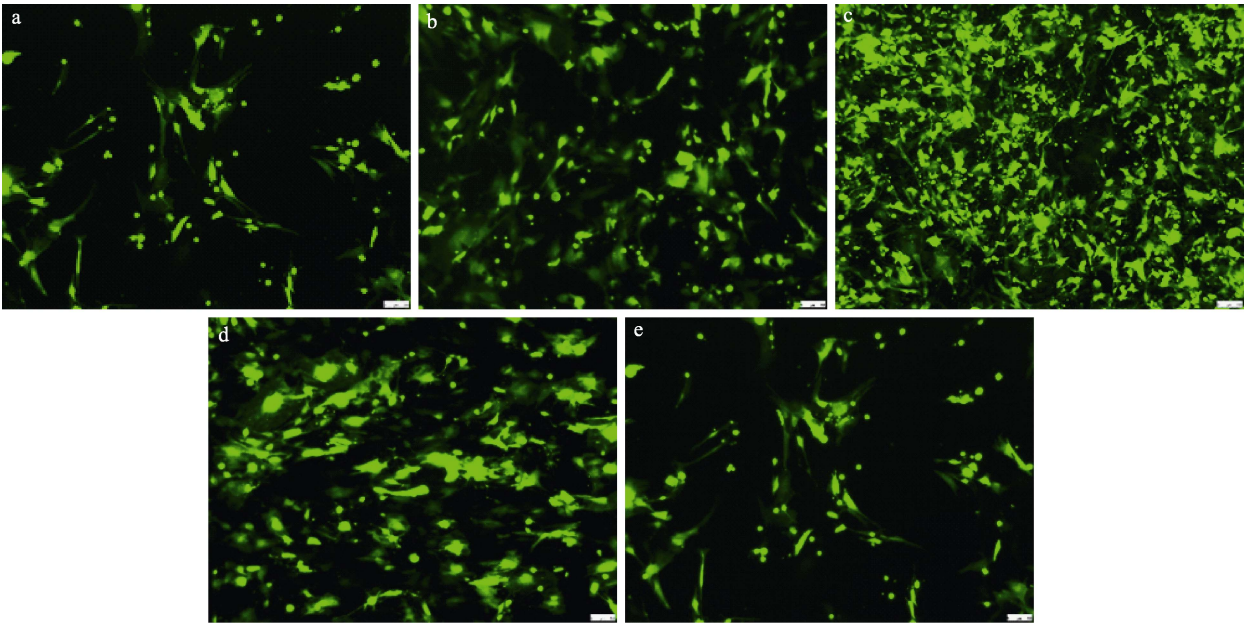


图 5 不同质粒浓度对翘嘴鲌脑细胞转染的影响(×100)  
a. 2 μg; b. 4 μg; c. 6 μg; d. 8 μg; e. 10 μg  
Fig. 5 Effect of different plasmid concentrations on the transfection of *Siniperca chuatsi* cells (×100)  
a. 2 μg; b. 4 μg; c. 6 μg; d. 8 μg; e. 10 μg

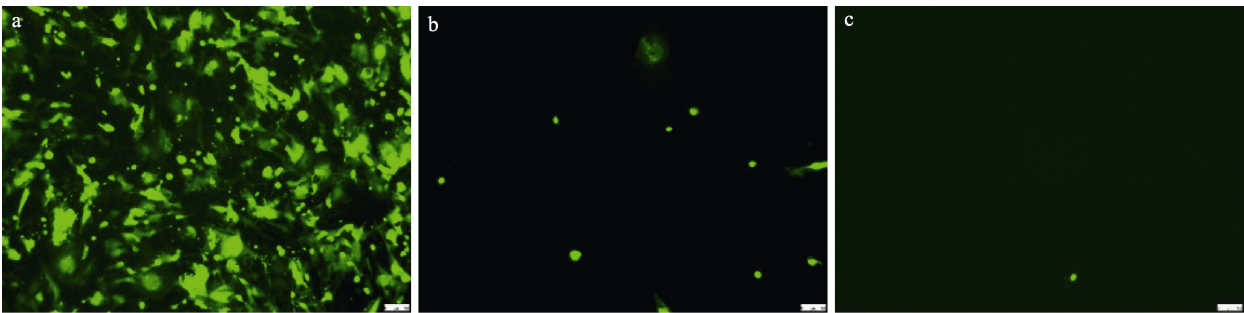


图 6 不同电击次数对翘嘴鲌脑细胞转染的影响(×100)  
a. 1 次; b. 2 次; c. 3 次  
Fig. 6 Effect of different times of electric shock on the transfection of Chinese perch cells (×100)  
a. 1 time; b. 2 times; c. 3 times

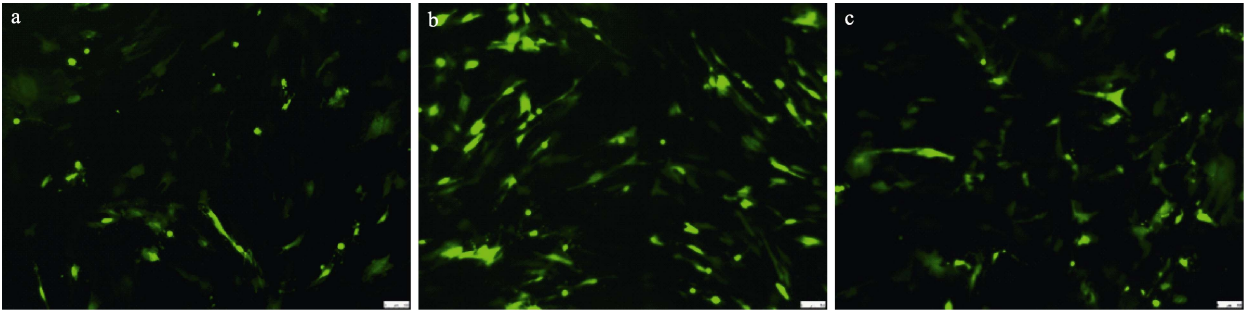


图 7 不同刺激时间对翘嘴鲌脑细胞转染的影响(×100)  
a. 24 h; b. 48 h; c. 72 h  
Fig. 7 Effect of different stimulation time on the transfection of *Siniperca chuatsi* cells (×100)  
a. 24 h; b. 48 h; c. 72 h

72 h。发现转染时间为 48 h 时, 转染效率最高。由图 4~7 可知, 最适条件为: 细胞密度  $1 \times 10^6/\text{mL}$  个、电压 240 V、脉冲时间 5 ms、质粒 6  $\mu\text{g}$ 、电击 1 次、转染 48 h。可见大部分荧光蛋白表达, 转染率较高, 表明 pcDNA3.1-EGFP 在体外成功转染翘嘴鲻脑细胞, 可进行后续实验。

## 2.5 过表达学习记忆相关基因 *c-fos*/*zif268* 检测及食欲基因的表达水平

利用 RT-PCR 技术检测过表达 *c-fos*/*zif268* 基因后, *c-fos*/*zif268* 基因的 mRNA 表达水平(图 8)。结果显示, 与对照组相比, 实验组 *c-fos*/*zif268* 基因的 mRNA 表达水平显著上升( $P < 0.05$ )。过表达 *c-fos* 基因后, 用 RT-PCR 技术检测食欲相关基因的 mRNA 表达水平(图 9)。结果显示, 与对照组相比, 实验组中 *pomc*、*npv* 基因的 mRNA 表达水平显著性上升( $P < 0.05$ )。过表达 *zif268* 基因后, 用 RT-PCR 技术检测食欲相关基因的 mRNA 表达水

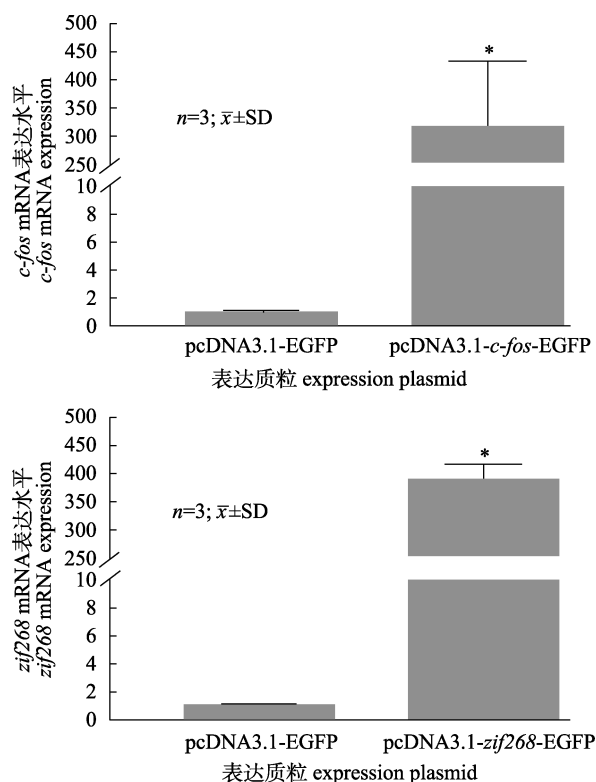


图 8 基因 *c-fos* (a) 和 *zif268* (b) 过表达后基因表达水平检测

\*表示两组之间存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

Fig. 8 Detection of gene expression level after overexpression of *c-fos* (a) and *zif268* (b)

\* denotes significant difference ( $P < 0.05$ ).

平(图 10)。结果显示与对照组相比, 实验组中的食欲相关基因 *mch*、*agrp*、*pomc*、*npv* 均无显著性差异( $P > 0.05$ )。

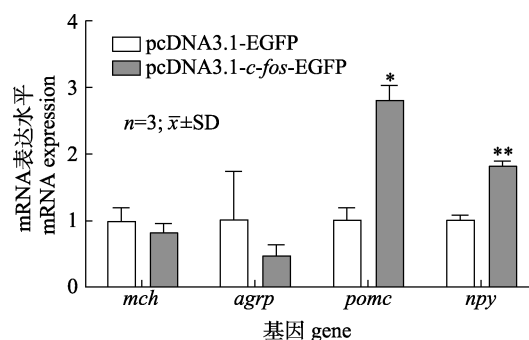


图 9 过表达 *c-fos* 基因后食欲相关基因表达水平检测

\*和\*\*分别表示 *c-fos* 过表达前后存在显著性( $P < 0.05$ )或极显著性差异( $P < 0.01$ )。

Fig. 9 Detection of appetite related gene expression level after overexpression of *c-fos* gene

\* and \*\* denote significant ( $P < 0.05$ ) and extremely significant ( $P < 0.01$ ) differences before and after overexpression, respectively.

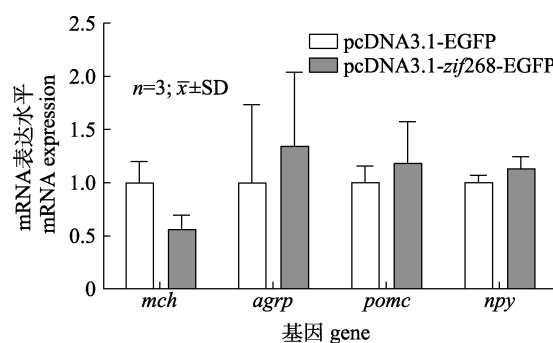


图 10 过表达 *zif268* 基因后食欲相关基因表达水平检测

\*表示 *zif268* 过表达前后存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

Fig. 10 Detection of appetite related gene expression level after overexpression of *zif268* gene

\* denotes significant difference before and after overexpression( $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

### 3.1 学习记忆基因的荧光载体构建

目前真核表达载体在鱼类中的构建与应用已有很多报道, Ye 等<sup>[25]</sup>构建了 RFP-advsa 3'-UTR 重组载体, 有助于标记达氏鲟原始生殖细胞(PGCs)并进行追踪观察; 黄小换<sup>[26]</sup>构建了 pT2AL-oroct4-EGFP 真核表达载体, 用来检测罗非鱼不同细胞的状态; 杨敏等<sup>[27]</sup>构建了 Tol2-actin-4-

2A-EGFP 真核表达载体, 以此探讨南极鱼中多聚三型抗冻蛋白基因的作用机制; 许巧倩等<sup>[28]</sup>构建了黄鳝 NK-lysin-pPIC9K 重组真核表达载体, 用于检测黄鳝抗菌肽蛋白对水环境中几种细菌的抑菌活性。这些研究在鱼类保护、鱼类繁殖育种以及疾病防控等方面都具有较强的应用价值。Dou 等<sup>[29]</sup>通过对翘嘴鲌行为学、基因表达等研究发现, 翘嘴鲌驯食与原癌基因 *c-fos* 和 *zif268* 密切相关, 但仍缺少 *c-fos*、*zif268* 真核表达载体构建与应用的相关研究。本研究选用 pcDNA3.1-EGFP 真核载体, 成功构建了翘嘴鲌学习记忆相关基因 pcDNA3.1-*c-fos*-EGFP、pcDNA3.1-*zif268*-EGFP 过表达载体, 为探讨学习记忆因子在翘嘴鲌驯食过程中对食欲基因的调控作用提供技术支持。

### 3.2 翘嘴鲌脑细胞电转染条件优化

电穿孔转染中电压、转染时长、电击次数和质粒浓度是影响细胞存活率和转染效率的关键因素<sup>[30-32]</sup>。李炎等<sup>[33]</sup>用 pEGFP-N1 载体质粒优化出草鱼肾细胞电转染的条件为: 细胞密度  $1.5 \times 10^7/\text{mL}$ , 电压 200 V, 脉冲时间 45 ms, 质粒 30  $\mu\text{g}$ , 电击 1 次。本研究以 pcDNA3.1-EGFP 载体质粒中的绿色荧光蛋白基因为报告基因进行电转实验。结果显示, 翘嘴鲌脑细胞电转染的最适条件为: 细胞密度  $1 \times 10^6/\text{mL}$ 、电压 240 V、脉冲时间 5 ms、质粒 6  $\mu\text{g}$ 、电击 1 次、转染 48 h。此条件下可见大部分荧光蛋白表达, 转染率较高, 表明 pcDNA3.1-EGFP 在体外成功转染翘嘴鲌脑细胞。电阻一定的前提下, 电压高低决定了通过细胞及电转液的电流大小, 对于转染效果和细胞存活率有很大影响<sup>[34]</sup>。由图 4e 可见, 在电压 260 V 的条件下, 细胞形态变大, 可能是由于外加电压太高导致电流变大, 细胞受到了损伤。从图 5d~5e 可以看出, 质粒的大小也会影响电转染的效果, 当质粒过大时, 细胞膜上的空洞闭合, 来不及导入细胞, 导致转染率显著下降<sup>[35]</sup>。建立翘嘴鲌脑细胞的电转染体系, 为以翘嘴鲌脑细胞为模型的研究提供了更有效的研究方法。

### 3.3 学习记忆相关因子对翘嘴鲌食欲相关基因的调控

相比未驯化的猪, 家养猪基因胰岛素样生长

因子 2 (insulin-like growth factor 2, IGF2) 表达上调<sup>[36]</sup>。生长激素 (growth hormone, GH) 在驯化菌株中表达水平升高<sup>[37]</sup>。然而对于哺乳动物学习记忆在驯化中的作用, 并未发现相关分子机制研究<sup>[6]</sup>。笔者之前的研究表明, *c-fos*、*zif268* 可能是影响鱼类驯食的关键基因<sup>[11]</sup>。激活蛋白 1 (activator protein 1, AP-1) 家族成员 c-Fos 在细胞凋亡中起着重要作用, 并且 c-Fos 的下游靶标已在广泛的正常发育和致癌作用中得到鉴定<sup>[38-39]</sup>。Tu 等<sup>[40]</sup>研究发现 *c-fos* 过表达可导致成软骨细胞转化, 有助于骨肉瘤的形成。徐标等<sup>[41]</sup>发现 *c-fos* 过表达可抑制转化生长因子  $\beta 1$  (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) 过度表达引起的纤维化作用。张爱华等<sup>[42]</sup>证实肾小球肾炎大鼠肾组织中 *c-fos* 表达上调后增强单核细胞趋化蛋白的表达。本研究表明, 翘嘴鲌脑细胞中过表达 *c-fos* 基因后, *c-fos* 基因表达水平显著性上调, 食欲相关基因 *pomc* 和 *npv* 的 mRNA 水平均显著性上升。相似地, Boutillier 等<sup>[43]</sup>的研究表明敲除 *AP-1* 位点后大大降低 *c-fos* 和 *pomc* 的表达, 表明 *c-fos* 作为一个转录因子基因很可能调控了翘嘴鲌摄食相关的靶基因 *pomc* 和 *npv*。ZIF268 是一种含有锌指结构的转录因子, 属于即刻早期基因家族 (IEGs)<sup>[44]</sup>, 通过调控其下游决定细胞核型变化的长期反应基因表达来诱导细胞凋亡<sup>[45]</sup>。本研究表明, 翘嘴鲌过表达 *zif268* 基因后, 未发现食欲相关基因有差异表达。

## 4 结论

综上所述, 本研究构建了翘嘴鲌学习记忆过表达载体, 优化了翘嘴鲌脑细胞转染条件, 并在此研基础上成功过表达了学习记忆相关基因 *c-fos/zif268*。发现 *c-fos* 可能为翘嘴鲌驯化相关学习通路中关键学习记忆相关基因, 可影响食欲相关基因 *pomc* 和 *npv* 的表达, 为进一步了解学习记忆促进鱼类新食性形成的作用机制, 并通过有效提高鲌学习记忆能力来解决鲌饲料养殖过程中难驯化及驯化不稳定问题提供了理论依据。

### 参考文献:

- [1] Guille L M, Morgan K V, Hall Z J, et al. Food preference



- and copying behaviour in zebra finches, *Taeniopygia guttata*[J]. Behavioural Processes, 2014, 109: 145-150.
- [2] Brown C, Laland K. Social enhancement and social inhibition of foraging behaviour in hatchery-reared Atlantic salmon[J]. Journal of Fish Biology, 2002, 61(4): 987-998.
- [3] Brown C, Laland K N. Social learning in fishes: A review[J]. Fish and Fisheries, 2003, 4(3): 280-288.
- [4] Magnhagen C, Staffan F. Social learning in young-of-the-year perch encountering a novel food type[J]. Journal of Fish Biology, 2003, 63(3): 824-829.
- [5] Diéguez C, Vazquez M J, Romero A, et al. Hypothalamic control of lipid metabolism: Focus on leptin, ghrelin and melanocortins[J]. Neuroendocrinology, 2011, 94(1): 1-11.
- [6] Huber L, Range F, Voelkl B, et al. The evolution of imitation: What do the capacities of non-human animals tell us about the mechanisms of imitation?[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2009, 364(1528): 2299-2309.
- [7] Braithwaite V A, Salvanes A G V. Environmental variability in the early rearing environment generates behaviourally flexible cod: Implications for rehabilitating wild populations[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2005, 272(1568): 1107-1113.
- [8] Dill L M. Adaptive flexibility in the foraging behavior of fishes[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1983, 40(4): 398-408.
- [9] Ryer C H, Olla B L. Information transfer and the facilitation and inhibition of feeding in a schooling fish[J]. Environmental Biology of Fishes, 1991, 30(3): 317-323.
- [10] Chapman B B, Ward A J W, Krause J. Schooling and learning: Early social environment predicts social learning ability in the guppy, *Poecilia reticulata*[J]. Animal Behaviour, 2008, 76(3): 923-929.
- [11] Laland K N, Williams K. Shoaling generates social learning of foraging information in guppies[J]. Animal Behaviour, 1997, 53(6): 1161-1169.
- [12] Peng J, Dou Y Q, Liang H, et al. Social learning of acquiring novel feeding habit in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(18): 4399.
- [13] Countryman R A, Kaban N L, Colombo P J. Hippocampal c-fos is necessary for long-term memory of a socially transmitted food preference[J]. Neurobiology of Learning and Memory, 2005, 84(3): 175-183.
- [14] Alberini C M. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity[J]. Physiological Reviews, 2009, 89(1): 121-145.
- [15] Zhou H J, Sun X L, Zhong G, et al. Effects of cannabinoid receptor 1 antagonist rimonabant on gene expression of hypothalamic appetite regulation factor and adenosine monophosphate-activated protein kinase of broilers[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(1): 258-265. [周华金, 孙晓蕾, 钟光, 等. 大麻素受体 1 拮抗剂利莫那班对肉仔鸡下丘脑食欲调控因子和腺苷酸激活蛋白激酶基因表达的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(1): 258-265.]
- [16] Liu J P, Wei W K, Yu Y P. Research progress of melanin concentrate on the regulation of appetite and body weight[J]. Livestock and Poultry Industry, 2006(6): 22-24. [刘金萍, 魏文康, 余永鹏. 黑素浓缩素对食欲和体重的调控研究进展[J]. 畜禽业, 2006(6): 22-24.]
- [17] Loh K, Herzog H, Shi Y C. Regulation of energy homeostasis by the NPY system[J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2015, 26(3): 125-135.
- [18] Takeuchi S. Agouti-related protein[M]//Handbook of Hormones[M]. Pittsburgh: Academic Press, 2016: 70-71.
- [19] Gomori A, Ishihara A, Ito M, et al. Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice[J]. American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism, 2003, 284(3): E583-E588.
- [20] Li Q H, Wang N, Du Z, et al. Gastrocnemius transcriptome analysis reveals domestication induced gene expression changes between wild and domestic chickens[J]. Genomics, 2012, 100(5): 314-319.
- [21] Liang X F. The study on artificial feed of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2002, 29(2): 64-67. [梁旭方. 鳊鱼人工饲料的研究[J]. 水产科技情报, 2002, 29(2): 64-67.]
- [22] He S, Liang X F, Sun J, et al. Insights into food preference in hybrid F1 of *Siniperca chuatsi* (♀) × *Siniperca scherzeri* (♂) mandarin fish through transcriptome analysis[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 601.
- [23] Shi L J, Liang X F, He S, et al. Primary culture and identification of brain neurons in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(1): 43-48. [石林杰, 梁旭方, 何珊, 等. 鳊脑神经元的原代培养与鉴定[J]. 水产学报, 2020, 44(1): 43-48.]
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] Ye H, Yue H M, Yang X G, et al. Identification and sexually dimorphic expression of vasa isoforms in Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*), and functional analysis of vasa 3'-untranslated region[J]. Cell and Tissue Research, 2016, 366(1): 203-218.

- [26] Huang X H. The expression, pluripotent activity and transcriptional regulation of Oct4 from Nile tilapia[D]. Chongqing: Southwest University, 2016. [黄小换. 尼罗罗非鱼 Oct4 的表达、多能性活性及转录调控研究[D]. 重庆: 西南大学, 2016.]
- [27] Yang M, Huang Q, Chen L B. Construction of type III antifreeze protein eukaryotic expression plasmid and expression in zebrafish cell line[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2016, 28(11): 1862-1866. [杨敏, 黄巧, 陈良标. 南极鱼 III 型抗冻基因真核表达质粒的构建及其细胞表达[J]. 浙江农业学报, 2016, 28(11): 1862-1866.]
- [28] Xu Q Q, Tang D D, Xia L H, et al. Eukaryotic expression of the swamp eel NK-lysin in *Pichia pastoris* and analysis of antibacterial activity *in vitro*[J]. Biotechnology, 2019, 29(4): 317-323. [许巧情, 汤东东, 夏理海, 等. 黄鳝 NK-lysin 基因的真核表达与体外活性分析[J]. 生物技术, 2019, 29(4): 317-323.]
- [29] Dou Y Q, He S, Liang X F, et al. Memory function in feeding habit transformation of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(4): 1254.
- [30] Chang C C, Wu M N, Yuan F, et al. Role of specific endocytic pathways in electrotransfection of cells[J]. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development, 2014, 1: 14058.
- [31] Canatella P J, Karr J F, Petros J A, et al. Quantitative study of electroporation-mediated molecular uptake and cell viability[J]. Biophysical Journal, 2001, 80(2): 755-764.
- [32] Jiang X, Yang P, Li Y, et al. Optimization of electransfection for Jurkat T cell[J]. Chongqing Medicine, 2011, 40(15): 1463-1465. [江雪, 杨平, 李玥, 等. 人急性淋巴细胞白血病细胞株 T 细胞电转染条件的优化[J]. 重庆医学, 2011, 40(15): 1463-1465.]
- [33] Li Y, Zhang Y N, Lv L Q. Optimization of electroporation parameters for *Ctenopharyngodon idellus* kidney cells and transient expression of grass carp reovirus NS26 protein[J]. Chinese Journal of Virology, 2014, 30(3): 278-284. [李炎, 张娅楠, 吕利群. 草鱼肾细胞电转条件的优化及草鱼呼肠孤病毒 NS26 蛋白的瞬时表达[J]. 病毒学报, 2014, 30(3): 278-284.]
- [34] Ekici Y, Tezcaner T, Aydın H O, et al. Arterial complication of irreversible electroporation procedure for locally advanced pancreatic cancer[J]. World Journal of Gastrointestinal Oncology, 2016, 8(10): 751-756.
- [35] Luo W, Ai L, Zhou Y. Establishment and verification of transformation conditions for mouse RAW264.7 macrophages by electroporation[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2020, 28(2): 193-200. [罗维, 艾磊, 周越. 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞电穿孔转染条件的建立和验证[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 193-200.]
- [36] Nezer C, Moreau L, Brouwers B, et al. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the *IGF2* locus in pigs[J]. Nature Genetics, 1999, 21: 155-156.
- [37] Favier R P, Mol J A, Kooistra H S, et al. Large body size in the dog is associated with transient GH excess at a young age[J]. The Journal of Endocrinology, 2001, 170(2): 479-484.
- [38] Tian L X, Li X Y, Tang X, et al. Ellipticine conveys protective effects to lipopolysaccharide-activated macrophages by targeting the JNK/AP-1 signaling pathway[J]. Inflammation, 2020, 43(1): 231-240.
- [39] Zhang X P, Zhang L, Yang H M, et al. c-Fos as a proapoptotic agent in TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells[J]. Cancer Research, 2007, 67(19): 9425-9434.
- [40] Tu Y C, Huang D Y, Shiah S G, et al. Regulation of c-Fos gene expression by NF- $\kappa$ B: A p65 homodimer binding site in mouse embryonic fibroblasts but not human HEK293 cells[J]. PLoS ONE, 2013, 8(12): e84062.
- [41] Xu B, Han C R. Inhibition of quercetin on expressions of c-Fos, c-Jun mRNA, and TGF- $\beta$ 1 liver tissue of hepatic fibrosis mice infected by schistosome[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2006, 37(3): 393-398. [徐标, 韩春荣. 槲皮素对血吸虫肝纤维化小鼠肝组织 c-Fos、c-Jun mRNA 和 TGF- $\beta$ 1 表达的抑制作用[J]. 中草药, 2006, 37(3): 393-398.]
- [42] Zhang A H, Huang S M, Ding G X, et al. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mesangial cells by angiotensin II: Role of c-Jun N-terminal kinase c-Jun / activator protein-1 signal pathway[J]. Chinese Journal of Pathology, 2004, 33(6): 550-554. [张爱华, 黄松明, 丁桂霞, 等. c-Jun 氨基末端激酶-激活蛋白 1 信号通路调控血管紧张素 II 诱导的单核细胞趋化蛋白 1 表达[J]. 中华病理学杂志, 2004, 33(6): 550-554.]
- [43] Boutillier A L, Monnier D, Lorang D, et al. Corticotropin-releasing hormone stimulates proopiomelanocortin transcription by cFos-dependent and -independent pathways: Characterization of an AP1 site in exon 1[J]. Molecular Endocrinology, 1995, 9(6): 745-755.
- [44] Thiel G, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1[J]. Journal of Cellular Physiology, 2002, 193(3): 287-292.
- [45] Virolle T, Adamson E D, Baron V, et al. The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling[J]. Nature Cell Biology, 2001, 3(12): 1124-1128.

## The effect of learning pathway genes on acquiring novel feeding behaviors in Chinese perch, *Siniperca chuatsi*

LIANG Hui<sup>1,2</sup>, HE Shan<sup>1,2</sup>, LIANG Xufang<sup>2</sup>

1. Anhui Province Key Laboratory of Aquaculture & Stock Enhancement, Fishery Institute of Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China;

2. College of Fisheries, Chinese Perch Research Center, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** Learning and memory play important roles in species obtaining new foraging skills and food preferences. In order to study the influence of learning and memory pathways on the regulation of feeding in Chinese perch *Siniperca chuatsi*, an overexpression vector of learning and memory related genes *c-fos* and *zif268* was constructed, and pcDNA3.1-EGFP was chosen as the reporter plasmid and transferred into Chinese perch brain cells by electroporation. The optimal electroporation conditions were determined by testing the transfection efficiency with different voltages, plasmid amounts, transfection times, and numbers of shocks. The results showed that learning and memory overexpression vector pcDNA3.1-*c-fos*-EGFP, pcDNA3.1-*zif268*-EGFP was successfully constructed. The maximum electroporation efficiency was achieved under the following conditions: in a 0.2 cm electroporation cuvette containing brain cells ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ), electric voltage 240 V, pulse time 5 ms, 6  $\mu\text{g}$  of plasmid, one electric shock, and transfection time of 48 h. We demonstrated that pcDNA3.1-EGFP was successfully transfected into Chinese perch brain cells *in vitro*. The mRNA expression levels of the appetite genes *agrp*, *pomc*, *mch*, *npv* were detected after overexpression of learning and memory genes. After overexpression of the *c-fos* gene, the mRNA expression of the appetite genes *pomc* and *mch* was significantly higher. After overexpression of the *zif268* gene, there were no significant changes in the mRNA expression levels of the *agrp*, *mch*, *npv* and *pomc* genes *in vitro*. In summary, the results confirm that social learning can promote the acquisition of feeding habits in Chinese perch through the *c-fos* signaling pathway. As a transcription factor, c-Fos is likely to regulate the expression of appetite genes *pomc* and *npv*.

**Key words:** *Siniperca chuatsi*; overexpression; electroporation; *c-fos*; *pomc*; *npv*

**Corresponding author:** HE Shan. E-mail: heshan@mail.hzau.edu.cn