

盐度对青鳉鱼肠内 $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}$ 基因表达的影响

冯 平^{1,2}, 王 峰³, 范光丽^{1*}

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100; 2. 榆林学院生命科学学院, 陕西榆林 719000;
3. 榆林市畜牧兽医中心站, 陕西榆林 719000)

摘 要: 用实时定量 RT-PCR(Q RT-PCR) 检测不同盐度对青鳉鱼肠内 $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}\alpha$ 和 $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}\beta$ 基因表达的影响。结果表明, 青鳉鱼肠内 $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}\alpha$ 基因表达量在 5 g/L、15 g/L 和 25 g/L 的盐水中不变, $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}\beta$ 基因表达在 15 g/L、25 g/L 的盐水中被显著抑制($P<0.05$)。盐度升高抑制青鳉鱼肠内 $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}\beta$ 基因表达。

关键词: 渗透压调节; 青鳉鱼; 肠; 基因表达; $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}$

中图分类号: S965 文献标识码: A 文章编号: 1004 1389(2006) 06 0024 04

The Effect of Salinity on Intestine $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}$ Genes Expression of Medaka (*Oryzias latipes*)

FENG Ping^{1, 2}, WANG Feng³ and FAN Guang li^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China; 2. College of Life Science, Yulin College, Yulin Shaanxi 719000, China; 3. Yulin Veterinay Central Station, Yulin Shaanxi 719000, China)

Abstract: Quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction (Q RT-PCR) was used to study the $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}\alpha$ and $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}\beta$ genes expression in the intestine of medaka exposed to different salinity. The results showed that the $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}\alpha$ genes expression in the intestine of medaka is invariable at 5, 15, 25 g/L of salt, gene expression of the $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}\beta$ was significantly restrained at 15, 25 g/L of Salinity ($P<0.05$). The increase of salinity inhibits gene expression of the $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}\beta$ in the intestine of medaka.

Key words: Osmoregulation; Medaka; Intestine; Genes expression; $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}$

近年来, 广盐性硬骨鱼类渗透压调节的分子机制已成为鱼类生理学的重要研究内容。广盐性硬骨鱼盐度适应过程中, 血液皮质醇、生长激素水平增加, 刺激鳃上氯细胞内 $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}$ mRNA 的表达, 提高酶的活性^[1,2], 酶活性的增加与氯细胞数量的增加以及鳃 Na^{+} 外排量成正比^[3]。鱼类渗透压调节过程中 $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}$ (α 和 β 亚基) 起重要作用。目前, 渗透压调节分子水平的研究多在鳃 $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}$ 基因表达及调控上^[4], 而肠内 $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}$ 基因表达变化的研究甚少, 但肠也是维持水和盐平衡的重

要组织器官。青鳉鱼是一种淡水生型广盐性鱼类, 并且能在海水中繁殖。2001 年, Sakamoto 等研究表明青鳉鱼可以作为研究渗透压调节机制的模式鱼^[5], 所以研究青鳉鱼在不同盐度下肠内 $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}$ 基因表达变化有重要意义。

实时定量 PCR 是指在 PCR 指数扩增期间通过连续监测荧光信号的强度来即时测定特异性产物的量, 并据此推断目的基因的初始量^[6]。具有很高的敏感性、重复性和特异性。

本研究用实时定量 RT-PCR, 检测不同盐度下青鳉鱼肠内 $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}\text{ATPase}\alpha$ 和 $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$

收稿日期: 2006 01 24 修回日期: 2006 04 10
作者简介: 冯 平(1980-), 男, 汉, 陕西米脂人, 助教, 在读硕士, 从事动物寄生虫发生及其发病机理研究。
* 通讯作者。

ATPase β 的基因表达量, 分析了盐度对各基因表达的影响, 以期为硬骨鱼类渗透压调节的分子机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

成年青鲮鱼(*Oryzias latipes*, Medaka; Orange Red 品系)。

氯化钠(北京化学试剂公司), MS 222 购自 Sigma 公司, DNAase I 试剂购自大连宝生物公司, Trizol、Oligo (dT)、RNase inhibitor 和反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司, SYBR[™] Green PCR Master Mix、96 孔光学 PCR 板和光学透明塑料盖膜购自 Applied Biosystems 公司。

1.2 方法

实验用鱼分 4 组, 分别暴露于 0 g/L、5 g/L、15 g/L、25 g/L 的盐水中, 每组 10 尾, 雌雄各半。每天投食 2 次, 饲料为新孵化的卤虫。试验期间, 水温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 光周期为 16 h 昼, 8 h 夜, 14 d 后采样。采样时, 用 MS 222(100 mg/L)麻醉鱼, 然后解剖分离肠入液氮速冻, 保存到提取总 RNA

为止。总 RNA 提取采用 Trizol 试剂, 按照其使用说明进行。所提总 RNA 经 DNAase I 处理及纯化后, 采用 SuperIII 反转录酶合成 cDNA。每组随机选取雌雄鱼各 3 尾进行研究。

实时定量 PCR 采用美国应用生物系统公司生产的 ABI Prism 7000 Sequence Detection System(Applied Biosystems)。用 Express primer 2.0 设计 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase α 、 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase β 、GAPDH 基因的引物(表 1), 由大连宝生物公司合成。PCR 反应液: SYBR[™] Green PCR Master Mix 10 μL 、25 mmol/L 正义和反义引物各 0.4 μL 、cDNA 反应液 1 μL , 加双蒸馏水至 20 μL 。PCR 反应条件 50°C 2 min, 95°C 10 min, 40 个循环: 95°C 15 s, 60°C 60 s。在最后一个循环结束后做裂解曲线, 确定 PCR 反应质量(图 1B)。各个基因的标准品来源于普通 PCR 产物, 制备标准曲线(图 1A)。

本文结果以目标基因与内参基因(GAPDH)的 mRNA 拷贝数比值表示, 各组间比较采用独立样品 *t* 检验, $P < 0.05$ 时认为差异显著。

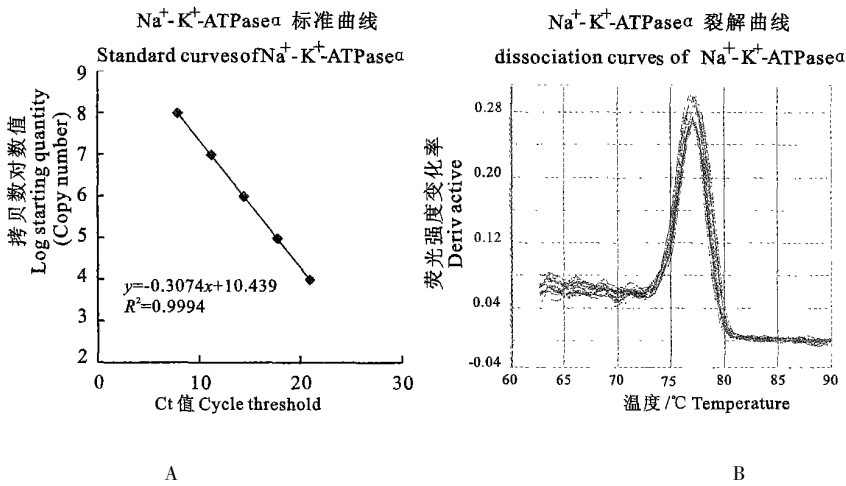


图 1 青鲮鱼 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase α 基因实时定量 PCR SYBRGreen 荧光染料法的标准曲线和裂解曲线
Fig 1 Standard curves and heat dissociation curves for medaka $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase α gene by SYBR Green detection

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1 Primer pairs of SYBR[™] Green Real time PCR

基 因 Genes	引物 Primer	引物序列 Sequence
Na/K ATPase alpha (DQ486033)	上游引物(Forward)	5'- TCCTGGCAGACAACAAGACAAAGT 3'
	下游引物(Reverse)	5'- GAGGCATCTCCAGCCACATG 3'
Na/K ATPase beta (DQ486034)	上游引物(Forward)	5'- GCAAACCGTG TGTCA TTG TGA 3'
	下游引物(Reverse)	5'- GGATGCTGTCTGTTGGAGAAG 3'
GAPDH (AU179219)	上游引物(Forward)	5'- TGTGGAAAAGGCCTCACTTCA 3'
	下游引物(Reverse)	5'- CAGACACGACCACACGCTGT 3'

2 结果与分析

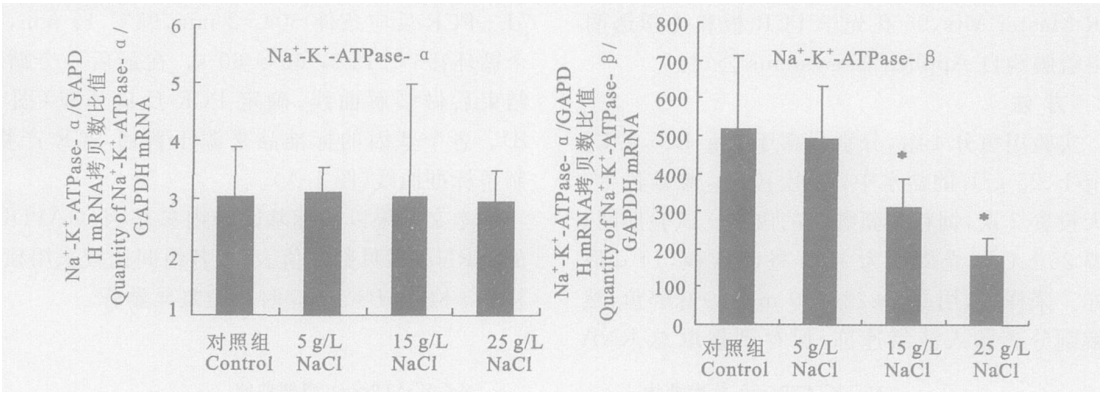
2.1 盐度对青鲮鱼肠内 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\alpha$ 基因表达的影响

$\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\alpha$ 基因是表达青鲮鱼 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ 酶 α 亚基的主要基因。从图 2 可以看出,暴露盐水组肠内 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\alpha$ 与对照组相比,各组的 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\alpha$ mRNA 水平无显著性变化。对照组肠内 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\alpha$ 的 mRNA 水平为 3.02 ± 0.87 ($\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\alpha$ / GAPDH mRNA 的拷贝数比值,以下类同);5 g/L 组为 3.12 ± 0.43 、15 g/L 和 25 g/L 盐水组的水

平分别是 3.04 ± 1.92 、 2.95 ± 0.55 。

2.2 盐度对青鲮鱼肠内 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\beta$ 基因表达的影响

$\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\beta$ 基因是编码青鲮鱼 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ 酶 β 亚基的重要基因。由图 2 可见, $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\beta$ 基因表达随盐度升高呈明显下降趋势($P < 0.05$)。对照组肠内 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\beta$ mRNA 水平为 514.50 ± 195.21 。5 g/L 组 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\beta$ 表达量是 491.21 ± 140.11 ,与对照组相比差异不显著;15 和 25 g/L 暴露组的水平分别为 308.18 ± 76.15 、 180.25 ± 50.21 ,分别约为对照组的 0.6 倍、0.35 倍。



实时定量 RT-PCR SYBR Green 荧光染料法(平均值 $\pm$ 标准偏差, $n = 6$), * 实验组与对照组相比差异显著($P < 0.05$). 5, 15, 25 g/L exposed groups by real time PCR, SYBR Green detection (mean $\pm$ S. D. $n = 6$, * $p < 0.05$).

图 2 盐度对青鲮鱼肠内 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\alpha$ 基因和 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\beta$ 基因表达的影响

Fig. 2 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\alpha$ and $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\beta$ gene expression in intestine of medaka in control and salt

3 讨论与结论

$\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ 主要功能是参与细胞内外 Na^+ 、 K^+ 跨膜转运,使细胞内外的离子浓度处于相对稳定的生理平衡状态。 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ 是硬骨鱼类渗透压调节组织中离子交换的关键性酶,它的基本结构是由一个 α 亚基(相对分子质量为 110 kD) 和一个 β 亚基(相对分子质量为 55 kD) 组成^[7],在哺乳动物中已经证实 α 和 β 亚基由不同基因编码,这两个亚基联合调控钠钾泵, $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\alpha$ 亚基分子量较大含有功能酶的酶触反应结构域,在硬骨鱼类上已经克隆了编码此亚基的基因^[8~11]。 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\beta$ 亚基分子量较小,其作用目前不清楚,但现有的研究表明,它是维持钠钾泵稳定性及正确膜定位的必要组成部分。编码硬骨鱼 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\beta$ 亚基的基因已被克隆^[11]。目前,研究渗透压调节的分子机制,集中于对鳃上 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ 基因的

表达,缺乏对肠的研究。本文用实时定量 RT-PCR,准确地检测了不同盐度下,青鲮鱼肠内 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\alpha$ 和 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\beta$ 基因表达量,为盐度影响硬骨鱼类肠内 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ 基因的转录,提供了基础数据。

2005 年,Deane 等研究表明皮质醇升高,海鲷(sea bream)鳃上氯细胞 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\alpha$ 基因转录水平增加, $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\beta$ mRNA 水平不变;生长激素增加,鳃上氯细胞内 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\alpha$ 和 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\beta$ 基因表达量都升高^[12]。然而本文实验结果表明,青鲮鱼肠内 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\alpha$ 基因的表达量未受盐度影响, $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}\beta$ 基因表达量在 15 和 25 g/L 盐水中显著降低,同 Semple^[10]、Deane^[12] 等对鳃上氯细胞的研究结果不一致,分析其原因可能是,肠内 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ 基因表达的调控机制与鳃不同,在盐度升高时,鳃上氯细胞的功能是排出体内多余的 Na^+ 和 Cl^- ,而肠道的主要功能是吸收水

分和 Na^{+} 等^[4], 由于肠道内 Na^{+} 和 Cl^{-} 浓度很高, 肠道是被动吸收 Na^{+} 和 Cl^{-} , 其 Na^{+} K^{+} AT P ase 可能对 Na^{+} 和 Cl^{-} 的吸收起抑制作用, Na^{+} K^{+} AT P ase β 基因表达量的降低可能对此具有重要意义。肠道内 Na^{+} K^{+} AT P ase 基因表达及调控同其功能的关系需进一步研究。

青鳉鱼肠内 Na^{+} K^{+} AT P ase α 基因表达量在 5、15、25 g/L 的盐水中不变, 肠内 Na^{+} K^{+} AT P ase β 基因表达在 15 和 25 g/L 的盐水中被显著抑制。

参考文献:

[1] McCormick S D. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish[J] . Amer Zool, 2001, 41: 781 ~ 794.

[2] Pelis RM, McComick S D. Effects of growth hormone and cortisol on Na^{+} , K^{+} , Cl^{-} cotransporter localization and abundance in the gills of Atlantic salmon[J] . Gen Comp Endocrinol, 2001, 124: 134 ~ 143.

[3] 林浩然. 鱼类生理学[M] . 广州: 广东高等教育出版社, 2000. 129 ~ 130.

[4] Shigehisa H, Toyoji K, Nobuko N. *et al.* Molecular biology of major components of chloride cells(review)[J] . Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 2003, 136: 593 ~ 620.

[5] Tomohiro K, Akiyoshi T, Hiroshi K. *et al.* Medaka (*Oryzias latipes*) as a model for hypoosmoregulation of euryhaline fishes Tatsuya Sakamoto[J] . Aquaculture, 2001, 193:

347 ~ 354.

[6] 阳成波, 印遇龙, 龚建华, 等. 实时定量 PCR 研究进展及其应用[J] . 中国预防兽医学报, 2003, 5(25): 395 ~ 399.

[7] Marshall W S, Bryson S E. Transport mechanisms of seawater teleost chloride cells: an inclusive model of a multifunctional cell[J] . Comp. Biochem. Physiol. A, 1998, 119: 97 ~ 106.

[8] Feng S H, Leu J H, Yang C H, *et al.* Gene expression of Na^{+} K^{+} AT P ase $\alpha 1$ and $\alpha 3$ subunits in gills of the teleost (*Oreochromis mossambicus*) adapted to different environmental salinities. Mar[J] . Biotechnol, 2002, 4 : 379 ~ 391.

[9] Semple J W, Green H J, Schulte P M. Molecular cloning and characterization of two Na/K AT P ase isoforms in *Fundulus heteroclitus*[J] . Mar. Biotechnol, 2002, 4: 512 ~ 519.

[10] Richards J G, Semple J W, Bystriansky J S. *et al.* Na^{+} ($+$) / K^{+} ($+$) AT P ase alpha isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer[J] . J. Exp. Biol, 2003, 206: 4475 ~ 4486.

[11] Blasiole B, Degrave A, Can V, *et al.* Differential expression of Na, K AT P ase alpha and beta subunit genes in the developing zebrafish inner ear[J] . Dev. Dyn, 2003, 228: 386 ~ 392.

[12] Eddie E, Deane Norman Y S. *et al.* Cloning and characterization of sea bream Na^{+} K^{+} AT P ase a and b subunit genes: In vitro effects of hormones on transcriptional and translational expression[J] . Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 331: 1229 ~ 1238

《西北农业学报》2005 年度引证研究报告

根据《中国核心期刊(遴选)数据库》2005 年 6000 种刊源样本的统计与结果分析,《西北农业学报》2005 年度被引计量指标和来源指标如下:

来源文献量	平均引文数	平均作者数	基金论文比	总被引频次	影响因子	即年指标	他引总引比	引用刊数	被引半衰期	引用半衰期
278	12.68	3.84	0.99	583	0.348	0.040	0.93	225	5.86	7.15