

## 大黄鱼碱性磷酸酶基因的克隆及表达特征分析

冯建军, 姚志刚, 张子平, 钟恩惠, 庄道华,  
林 鹏, 郭松林, 关瑞章, 王艺磊\*

(集美大学水产学院, 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心,  
农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

**摘要:**碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)是一种广泛分布的单脂磷酸水解酶,是动物生物代谢过程中重要的调控酶。实验首次克隆了大黄鱼 ALP 基因 cDNA 全序列,命名为 *LcALP*,其全长为 2 345 bp,开放阅读框为 1 629 bp,编码 543 个氨基酸。实时荧光定量 PCR 检测发现,*LcALP* 在大黄鱼雌雄各组织中均有表达,其中在眼和头肾的表达量最高,雌性鳃和脑中 *LcALP* 表达量显著高于雄性,而在性腺和脾脏中的表达量则显著低于雄性;胚胎发育过程中,多细胞期、囊胚期和原肠期 *LcALP* 基因表达水平相对较低,在卵黄栓形成期明显提高,至孵出期达到峰值,而初孵仔鱼期则显著下调;大黄鱼肌肉细胞系经 LPS 处理后 6 h *LcALP* 表达量降低,12 h 显著下调,而 poly I:C 处理后表达水平持续上升,24 h 显著上调至峰值。研究表明,*LcALP* 在大黄鱼胚胎发育调控以及机体免疫防御中发挥重要作用。

**关键词:**大黄鱼;碱性磷酸酶;脂多糖;胚胎发育

**中图分类号:** Q 785; S 965.3

**文献标志码:** A

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)是一种同型二聚体的金属酶,在碱性条件下能催化水解磷酸酯、磷酸核苷以及 6-磷酸核糖等含磷酸单酯键的非特异性水解酶,广泛存在于人体、动物、植物和微生物中,是生物代谢的重要酶类<sup>[1]</sup>。ALP 主要参与机体内的物质跨膜运输<sup>[2]</sup>、离子分泌<sup>[3]</sup>、蛋白质的合成<sup>[4]</sup>、软骨钙化<sup>[5]</sup>以及机体免疫防御<sup>[6-7]</sup>等,是生物体赖以生长、生存的重要酶类之一。动物 ALPs 由多个基因簇编码,分为非组织特异性 ALP(Tissue-Nonspecific Phosphatase, TSNALP)和组织特异性 ALP(Tissue-specific Phosphatase, TSALP)两类。目前,已有多种哺乳动物如人<sup>[8]</sup>、小鼠<sup>[9]</sup>、牛<sup>[10]</sup>等的 ALP 基因被克隆与分析。水产生物 ALP 基因研究相对较少,在贝类和甲壳类中仅有合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)<sup>[11]</sup>和北方长额虾(*Pandalus borealis*)<sup>[12]</sup> ALP cDNA 全长的报道。鱼类 ALP 的研究则主

要集中在 ALP 分离纯化、生长发育<sup>[13-15]</sup>以及活性检测<sup>[16-17]</sup>方面,而 ALP 基因表达与调控方面的研究仅限于斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[18]</sup>、大西洋鲑(*Salmo salar*)<sup>[19]</sup>、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[20]</sup>以及大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)<sup>[21]</sup>等少数种类。近年来,一些学者对于碱性磷酸酶参与鱼体免疫应答方面进行了探讨,发现牛膝多糖、甘露寡糖能够明显提高鱼体血清中碱性磷酸酶活性<sup>[16,22]</sup>,而鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染后的花鲈(*Lateolabrax japonicus*)血清 ALP 活性显著降低<sup>[17]</sup>,表明针对不同免疫刺激物,鱼体碱性磷酸酶的表达调控方式有着明显的差异。

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)是我国东南沿海的主要经济和养殖鱼类,其人工繁育技术的突破解决了大黄鱼人工养殖苗种来源匮乏的问题,促使大黄鱼成为我国养殖产量最大的海水鱼类之

收稿日期:2014-04-28 修回日期:2014-06-26

资助项目:国家自然科学基金(31272685);福建省海洋与渔业厅项目(201212140006);福建省教育厅(JA11150,JA09156);集美大学创新团队基金(2010A001);集美大学科研基金(C60819)

通信作者:王艺磊, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

—<sup>[23]</sup>。最近,葛明峰等<sup>[6]</sup>研究发现溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)和副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)对大黄鱼血清 ALP 活性有显著影响,但有关脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、poly I:C (polyinosinic polycytidylic acid, poly I:C)等不同病原模式分子引起的大黄鱼 ALP 基因表达变化尚未见报道。本实验首次克隆了大黄鱼 ALP 基因(命名为 *LcALP*)全长 cDNA,利用荧光定量 PCR 技术检测了该基因在大黄鱼各组织器官和胚胎发育各时期的表达情况,同时对 LPS 和 poly I:C 处理后的大黄鱼肌肉细胞系 ALP 基因表达谱的变化进行了研究,为深入了解大黄鱼 ALP 的结构、功能以及在胚胎发育和免疫防御中的作用机制奠定分子基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

大黄鱼取自福建省宁德市三都白基湾鱼排,雄鱼体质量为 300 ~ 400 g,雌鱼体质量为 500 ~ 600 g。活鱼解剖取各组织器官,并立即放入液氮冻存,随后取出置于 -80 °C 超低温冰箱保存;收集大黄鱼胚胎发育的 11 个时期,分别为多细胞期、囊胚期、原肠期、卵黄栓形成期、眼泡出现期、

胚孔关闭期、晶体出现期、尾牙期、心跳期、孵出期和初孵仔鱼期。各时期胚胎收集后立即放入液氮冻存,随后置于 -80 °C 超低温冰箱保存;大黄鱼肌肉细胞系(LYCMS)由本课题组构建和保存。

### 1.2 方法

**总 RNA 的提取及 cDNA 的合成** 采用 Trizol(Invitrogen)总 RNA 提取方法,参照产品说明书进行。用分光光度计测定总 RNA 在 OD<sub>260</sub> 的值,以计算浓度,并测定 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值检测 RNA 的纯度。取 1.5 μL 总 RNA 样品用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 RNA 的质量。

取 3 μg 头肾 RNA 与 1 μL oligo(dT) (10 μmol/L)、1 μL 的 5'/3' CDS Primer (10 μmol/L) 分别制备 RACE 模板。合成 5' CDS 第一链需再加 1 μL 的 SMART II,混合,加水至 6 μL。混匀后 70 °C 下 5 min,冰上放置 2 ~ 5 min 后,加入 2 μL 5 × First-strand Buffer, 1 μL dNTP Mix (10 μmol/L), 1 μL MMLV 逆转录酶 (200 U/μL, 购自 Promega 公司)。混匀后置 PCR 仪中: 37 °C 90 min, 70 °C 15 min。逆转录所用引物: UPM、NUP、5' CDS primer、3' CDS primer 以及 SMART II 见表 1。

表 1 实验中用到的引物及其序列  
Tab. 1 Oligonucleotide primers used in the experiments

引物名称 primer name	引物序列(5'→3') primer sequence	引物类别 usage
ALP-F	TGCGCBARRGAHGCAGGCAA	简并引物 degenerate primers
ALP-R	TCWACCYTCTCDGTCAGTGA	
ALP3-inner	TCACTGACAGAGATGGTGGA	3'-RACE 特异引物 specific primer for 3'-RACE
ALP5-inner	CACGGGTTGTTGTCACTATTCCTA	5'-RACE 特异引物 specific primer for 5'-RACE
UPM-Long	CTAATACGACTCACTATAGGGC AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT	RACE 通用引物 universal primers for RACE
UPM-Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
5' CDS primer*	(T)25VN	
3' CDS primer*	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN	
SMART II	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	
ALP-ORF5	ATGTTATGGCTGTCTAGAGTAATGCGTCAG	头至趾引物 head to toe PCR primers
ALP-ORF3	TCAGCACAGAAAATGGGTGACTGTGA	
5'real-ALP	GGCACCGCTACCGCTTAC	荧光定量引物 qRT-PCR primers
3'real-ALP	ACGGGTTGTTGTCACTATTCCTA	
5'-β-actin	TGCGTGACATCAAGGAGAAGC	
3'-β-actin	GTTGTAGGTGGTCTCGTGGATTC	

Notes: \* N = A, C, G, and T; V = A, G, and C

*LcALP* 基因片段的获得和全长 cDNA 的克隆 使用简并引物 ALP-F 和 ALP-R(表 1), 以上述 cDNA 为模板, 扩增 *LcALP* 基因片段。PCR 产物回收纯化后与 pMD19-T (TaKaRa) 载体连接, 转化到 JM109 感受态细胞, 于含有 Amp 的 LB 平板上培养 14 h, 挑取单克隆菌落, 接种于含 Amp 的 LB 培养基中, 37 °C 过夜培养, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆并测序。该序列经 BLAST 比对后, 确定是大黄鱼 *ALP* 基因。利用 Primer 5.0 所设计的 RACE 引物(表 1) 扩增其基因的全长 cDNA 序列, 并用 head to toe PCR 验证其开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 的正确性 (引物见表 1)。

*LcALP* 基因的生物信息学分析 利用 NCBI 数据库中 VecScreen、Blast、ORF Finder 等软件分析测序结果, 比对是否为目的基因并将其拼接成目的基因的全长 cDNA 序列。使用 ExPASy ([http://cn.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html)) 预测基因的等电点及分子量, SingalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SingalP>) 寻找基因可能存在的信号肽序列, 使用 NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测磷酸化位点, 使用 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测糖基化位点, 采用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白结构域, 采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行三级结构的预测, 利用 BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/>) 软件进行序列的多重比对, 利用 MEGA 4.0 软件中邻位相接法构建系统进化树。

*LcALP* 基因在不同组织及胚胎发育时期的表达分析 以 oligo(dT) 为引物, 按 Promage 逆转录酶说明书逆转录合成的 cDNA。选择  $\beta$ -actin 做为内参基因 (引物 5'- $\beta$ -actin 和 3'- $\beta$ -actin 见表 1), 荧光定量 PCR (quantitative real time PCR, qRT-PCR) 的反应体系为 20  $\mu$ L: 10  $\mu$ L SYBR Green Realltime PCR Master Mix (购自 TOYOBO 公司), 10  $\mu$ mol/L 的 5'-real-ALP 和 3'-real-ALP 引物(表 1) 各 0.5  $\mu$ L, 9  $\mu$ L cDNA 第一条链, 反应条件为 95 °C 预变性 1 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。检测基因的溶解曲线和扩增曲线, 对产物割胶测序, 以验证是否为基因特异产

物。每个阶段的大黄鱼分析 4 个样品, 并根据仪器分析得出各个样品的 RQ 值即  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , 基因表达水平由 RQ 平均值  $\pm$  标准误差 (mean  $\pm$  SE) 来表示, SPSS 软件对数据进行样本 *t*-检验分析, 显著性差异表示为  $P < 0.05$ 。

LPS、poly I:C 处理大黄鱼肌肉细胞系后 *LcALP* 基因表达分析 大黄鱼肌肉细胞系用 DMEM 培养基培养, 培养基中含 16.7% 胎牛血清 FBS、0.05%  $\beta$ -巯基乙醇、50  $\mu$ g/mL N-乙酰葡萄糖胺、50  $\mu$ g/mL 羧甲基纤维素钠、10  $\mu$ g/L Murine FGF-basic、5  $\mu$ g/L Human EGF、1  $\mu$ g/L Human HGF、100 IU/mL 青霉素以及 100  $\mu$ g/mL 赤霉素, 置于 27 °C 恒温培养, 细胞长满整瓶后用 0.25% 胰酶消化传入六孔板中, 待细胞长满孔板更换新鲜培养基, 同时分别加入终浓度为 50  $\mu$ g/mL poly I:C 以及 30  $\mu$ g/mL LPS 溶液处理细胞, 分别在 0, 3, 6, 12, 24 和 48 h 取样, 每个时相设 3 个重复。细胞样品经 PBS 溶液冲洗 2 次后采用 Trizol (Invitrogen) 总 RNA 方法提取。以 oligo(dT) 为引物, 按 Promage 逆转录酶说明书逆转录合成 cDNA, 选择  $\beta$ -actin 做为内参基因 (引物 5'- $\beta$ -actin 和 3'- $\beta$ -actin 见表 1), 选择引物 5'-real-ALP 和 3'-real-ALP (表 1) 特异性扩增 *LcALP* 基因片段, qRT-PCR 的方法与数据分析同上。

## 2 结果

### 2.1 *LcALP* 基因全长克隆及序列分析

*LcALP* 的 cDNA 全长 2 345 bp (GenBank 登录号: AEL33276), 包括 90 bp 的 5' 非编码区 (Untranslated Region, UTR)、623 bp 的 3' UTR 和 1632 bp 的 ORF。该基因编码 543 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 59.84 ku, 等电点为 6.81, 含有 12 个丝氨酸磷酸化位点、11 个苏氨酸磷酸化位点以及 6 个酪氨酸磷酸化位点 (图 1)。SMART 预测大黄鱼 *LcALP* 的结构域, 结果显示, 第 72 ~ 510 位置的氨基酸为 Alkaline phosphatase homologues (alkPPc) 核心结构域 (图 1), alkPPc 是 ALP 蛋白家族所共有的结构域。

### 2.2 *LcALP* 空间结构模拟

采用 SWISS-MODEL 软件的同源建模方法, 将 *LcALP* 蛋白序列与软件搜索得到的模板 (PDB code: c1ew2A\_) (crystal structure of a

<http://www.scxuebao.cn>

human phosphatase)人工进行联配,以 *LcALP* 推导的氨基酸构建其三维结构,*LcALP* 由 13 个  $\alpha$  螺旋和 14 个  $\beta$  折叠片组成,其蛋白序列三维丝带结构图与人类的 ALP 三维丝带结构图十分相似(图 2)。

### 2.3 *LcALP* 与其他物种 ALP 的多重比对及系统进化树分析

将推导的 *LcALP* 氨基酸序列与其他物种的 ALP 蛋白进行多序列比对(图 3),*LcALP* 有 7

个 Cys,其中 4 个在 *LcALP* 核心结构中的位置保守,与其他鱼类和哺乳类动物 ALP 相似。活性中心区域由保守的 Asp-Ser-Ala 三连体组成。与其他物种 ALP 比较发现,有 6 个可能的金属离子结合位点,2 个 N 糖基化位点和一个 GPI 锚定位点。另外在大黄鱼、大西洋鲑以及斑马鱼 ALP 的 C 末端均有 1 个 Cys,而在哺乳类 ALP 没有。

```

1 CACATTTGGATGTAGATTTCTGACCCGGATAACACCGATTGGACTGTGAGGCATCTACAGACGGGCTCTTTCAGCTACTCAAAGTGGCatgttatggctgtctagagtaatgcgtcag 120
1 M L W L S R V M R Q 10
121 ctgcacagagacgacaacatgaaggtgacagccctgctcatcatttgttcctcgtgatcttggggagtttgggaagctgcaatccctgaacaggagaaggacccaagtattggaat 240
11 L H R D D N M K V T A L L I I C S S L I L G S F G K L Q F P E Q E K D P K Y W N 50
241 acttggcccccagcggaccctaaagaatgcctggctgcaaaaactcaatacaaaaagcaagaatctcatcctcttccctcggagacggatgggtgtccccacgggtgacggcagct 360
51 T W A Q R T L K N A L V L Q K L N T N K A K N L I L F L G D G M G V P T V T A A 90
361 cgaatactgaagggctcagctgaacggacagagcggagaggaacgcagctggagatggacaagtcccttttggcttttggccaagacatacaacacaaatgcacaggtgcagacagc 480
91 R I L K G Q L N G Q S G E E T Q L E M D K F P F V S L A K T Y N T N A Q V P D S 130
481 gccggcaccgctaccgcttacctctcggggctcaagccaatgagggcacggttggagtgagtgccgcagctgtccgacccagtgtaacaccccagaggcaatgaagtcacctccata 600
131 A G T A T A Y L C G V K A N E G T V G V S A A A V R S Q C N T P E G N E V T S I 170
601 ctcatgggctaaagatgcagcaagttagtagaatgtgacaacaacccgtgtcaacatgcccagctcctacgcccacagtgtagacagagactggtagctccgacaat 720
171 L R W A K D A G K S V G I V T T R V N H A T P S A A Y A H S V D R D W Y S D N 210
721 gagatgccagctgaagctctcagctccggctcaagatatacgcagacaactcttgaacaattccaacattgatgtgatgatgggtggaggaggaagtatatgttaccacaaaac 840
211 E M P A E A L Q S G C K D I A R Q L F E N I P N I D V I M G G G R K Y M L P K N 250
841 acgtcggatgtagagtaccctggcatgcaaaacacagcggcacacgaaaagacggaagaacctgattcaagagtggactgacagaacgaagataaaaaaggccattatgtatggaac 960
251 T S D V E Y P G I A K H S G T R K D G R N L I Q E W T D R T K D K K G H Y V W N 290
961 aagaagcagctcttactgaaccctaaacacgtgattacttattggctctatttgaacccgggactcigtatatactgtaggaggaacaccgagactgatccttactgacagag 1080
291 K K Q L L S L N P N N V D Y L L A L F E P G D L I Y D L E R N T E T D P S L T E 330
1081 atggtggagtgccatcaagatcctgagaagaatcctaatggattttacctgtttagaaggaggacgaattgaccacggacacatgagggaagcccaagcaggctctttatgag 1200
331 M V E V A I K I L R K N P N G F Y L L V E G G R I D H G H H E G K A K Q A L Y E 370
1201 gctgtggaatggacagagccatcggccggcagatctcatgaccagatccacgatacactgactatagtactcggaccatcgcacgtgtcagctcggaggttacacctccaga 1320
371 A V E M D R A I G R A D L M T S I H D T L T I V T A D H S H V F S F G G Y T S R 410
1321 ggaatacaaatattggtctagcccaatgttgatgatgtgaccgaaaccttcacatccatcttatatgggaatggaccaggttataaattagttaacgggtgcaaggagaatgtc 1440
411 G N T I F G L A P M L S D V D Q K P F T S I L Y G N G P G Y K L V N G A R E N V 450
1441 tcacaatcactaccagaaacaactaccagctcagtcagctgacctctgagcagatggagacatggaggagagatgctcgtgtgttgctaaaggtcccctggctcacctgcta 1560
451 S T I D Y Q E N N Y Q A Q S A V P L S M E T H G G E D V A V F A K G P L A H L L 490
1561 catgggtccatgagcagaactacatccccacgtaatggcatatgacagctgtatcggcagaaacagggaacactgtaagttaaatatgcgtctgctggtttgcgccccctccttcg 1680
491 H G V H E Q N Y I P H V M A Y A G C I G Q N R E H C K L N N A S A G L R P V L S 530
1681 agcgtggcattcctctcagctcaccatcttctgtgctgaCCTTCCCTGACGGTCTCCTCACCTGATAAAAACCTGTTTTATCCAACACATTTCAATTTGTTGTTGTTTGTAAATGTT 1800
531 S V A F L L T V T H F L C * 543
1801 TAATTTACTACTATTTTGATCATGAAACCACTGTTAGGGCACCTTTGTGACAATACTATCAGGCAATGTTTAAAACATTACAAAATAAACCACCCCTGATGCAATGAAAGGAAA 1920
1921 AGTAGTACTGCAAGACACTGCAAAATCTGAGTTGTGATTTGCTATTGAATATTTTTTATTAAGGTTTTAGGACCCCTTTGTTGTGTAACCTGTTAGGTTGATAGATTGGATATGTG 2040
2041 TTTTCATATGATTAATGTGCAGAATCTACCTCATGAGCTTGCAAAAGATCTTTTGTAAATCATGGTGTGTTTAAAGACACATTTTCGATGGACAAATTAATGCCGAAACAGAGGCAGT 2160
2161 TGAATGTACAATTGACAATACAGTAAAGATATGATTTCTGTCTATTACCTGTGCATATGCAAAAAGGACAGAAAAGAGCCACCTACCATTGTTGTTGTTAGATAACAGAAAGTC 2280
2281 GTAACCTTTCACTAATAAGGAATGTTGTTTCTGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2345

```

图 1 大黄鱼 *LcALP* 基因 cDNA 及其推导的氨基酸序列

大写字母分别代表 5' 和 3' 非编码区序列,小写字母代表编码区序列;上面为核苷酸序列,对应下面为编码的氨基酸序列;起始密码子(ATG)、终止密码子(TGA)用加粗标示;丝氨酸、酪氨酸以及苏氨酸磷酸化位点分别用○、□以及下划线标示;alkPPc 结构域用灰色底纹标示

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *LcALP* gene from large yellow croaker

Capital letters represent the sequence of 5' and 3' untranslated region separately. Lowercase letters represent the coding sequence, with nucleotide sequence above and coded amino sequence below. The initiation codon(ATG) and the stop codon(TGA) are characterized in bold. Potential phosphorylation sites of the Ser, Tyr, and Thr are indicated by ○, □, and \_, respectively. The alkPPc domain is shaded

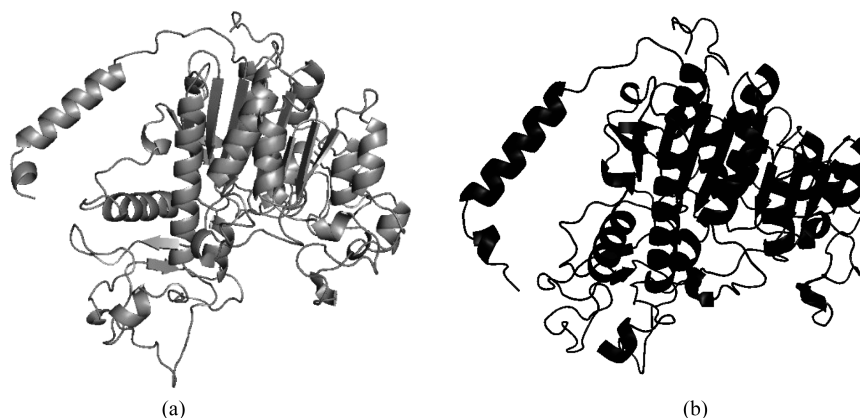


图2 大黄鱼 ALP 空间结构模拟 (a) 与人类磷酸酶的空间结构 (b)

Fig.2 Predicted three-dimensional structure of LcALP (a) and three-dimensional structure of a human phosphatase (b)

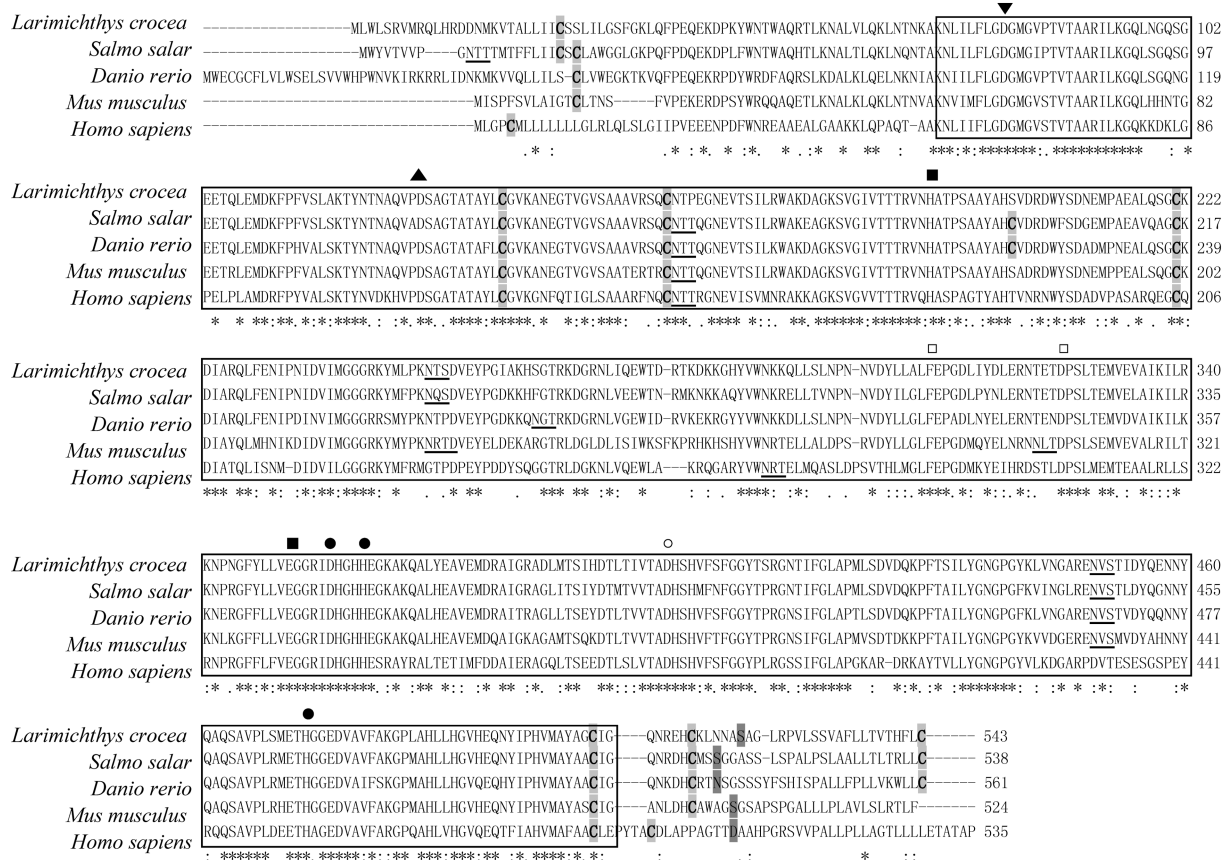


图3 LcALP 和其他物种 ALP 氨基酸序列的多重比较

左侧物种名称及相应的登录号分别为:*Larimichthys crocea*; 大黄鱼 (AEL33276); *Salmo salar*; 大西洋鲑 (ACI33254); *Danio rerio*; 斑马鱼 (AFU97155); *Mus musculus*; 小鼠 (CAA31775); *Homo sapiens*; 人 (AAH09647)。LcALP 核心结构用方框标示, 酶活性中心区域用▲标示, 保守的 Cys 用黑体加阴影标示, GPI 锚定位点用灰体标示, N 糖基化位点下划线标示。可能的 Mg 结合位点用■表示, Ca 结合位点用□表示, Zn<sup>1+</sup> 结合位点用●表示, Zn<sup>2+</sup> 结合位点用○表示, 同时可能与 Mg 和 Zn<sup>2+</sup> 结合位点用▼表示。Clustal W 比对后相同氨基酸残基用 (\*) 标示, 相似的氨基酸残基分别用 (; 或 |) 标示

Fig.3 Multiple alignment of the LcALP amino acid sequence between large yellow croaker and other species

Species and Genbank Accession numbers are listed on the left: *Larimichthys crocea* (AEL33276); *Salmo salar* (ACI33254); *Danio rerio* (AFU97155); *Mus musculus* (CAA31775); *Homo sapiens* (AAH09647). Boxed aminoacids correspond to the ALP domain. Cysteins are shaded in black. putative GPI-anchor signal is shaded in grey. Active site is marked with (▲). residues predicted to bind to magnesium (■), to calcium (□), to zinc1 (●), to zinc2 (○) and to both magnesium and zinc2 (▼). The putative N-glycosylation sites are underlined. Identical (\*) and similar (; or |) residues identified by the ClustalW program were indicated

## 2.4 LcALP 和其他物种 ALP 氨基酸序列系统发育树分析

NJ 系统发育树表明: *LcALP* 和金头鲷 (*Sparus aurata*) ALP 遗传距离最近, 并与其他鱼类 ALP 聚为一支, 哺乳类 ALP 聚为一支, 两栖类单独成为一支, 为鱼类和哺乳类 ALP 的过渡, 这三支合并为一大支; 而北方长额虾 (*Pandalus borealis*)、家蚕 (*Bombyx mori*)、合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 以及弧菌 (*Vibrio sp.*) ALP 分别形成独立分支, 与 *LcALP* 距离较远 (图 4)。

## 2.5 LcALP 基因在大黄鱼雌雄不同组织的表达

*LcALP* 基因在雌雄大黄鱼各组织器官中均有表达, 且在眼中的表达量最高; 雌性脑、头肾, 雄性脑、头肾、性腺以及脾脏中也有较高的表达水平; 雄性性腺 *LcALP* 表达量显著高于雌性 ( $P < 0.05$ ), 在脾脏中达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ), 而雌性大黄鱼脑 *LcALP* 表达量则显著高于雄性 ( $P < 0.05$ ), 在鳃中达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ) (图 5)。

## 2.6 LcALP 基因在胚胎发育不同时期的表达

在大黄鱼胚胎发育过程中, 多细胞期 *LcALP* 基因表达水平相对较低, 而在囊胚期和原肠期的表达水平有所升高, 分别为多细胞期的 3.05 和 3.60 倍。从卵黄栓形成期开始 *LcALP* 基因表达水平有了明显提高, 为原肠期的 2.8 倍。眼泡出现期、胚孔关闭期、晶体出现期、尾牙期以及心跳期 *LcALP* 基因表达水平持续上升, 并在孵出期达到峰值, 其表达水平是原肠期的 11.36 倍, 与其他发育时期均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 而初孵仔鱼期 *LcALP* 表达水平则显著降低 ( $P < 0.05$ ), 仅

为孵出期的 1/4 (图 6)。

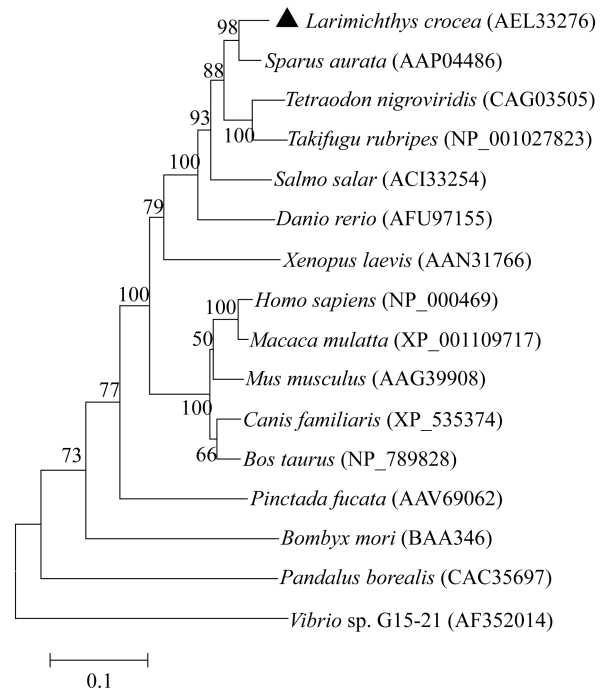


图 4 *LcALP* 和其他物种 ALP 氨基酸序列系统发育树 (*LcALP* 用 ▲ 标出)

Fig. 4 Phylogenetic tree of the ALP amino acid sequences between large yellow croaker and other species (The solid triangle marks the *LcALP*)

*Mus musculus*: 小鼠; *Canis familiaris*: 狗; *Homo sapiens*: 人; *Bos taurus*: 牛; *Macaca mulatta*: 猕猴; *Pandalus borealis*: 北方长额虾; *Bombyx mori*: 家蚕; *Vibrio sp. G15-21*: 弧菌; *Larimichthys crocea*: 大黄鱼; *Sparus aurata*: 金头鲷; *Tetraodon nigroviridis*: 黑青斑河豚; *Takifugu rubripes*: 红鳍东方鲀; *Salmo salar*: 大西洋鲑; *Danio rerio*: 斑马鱼; *Xenopus laevis*: 非洲爪蟾; *Pinctada fucata*: 合浦珠母贝

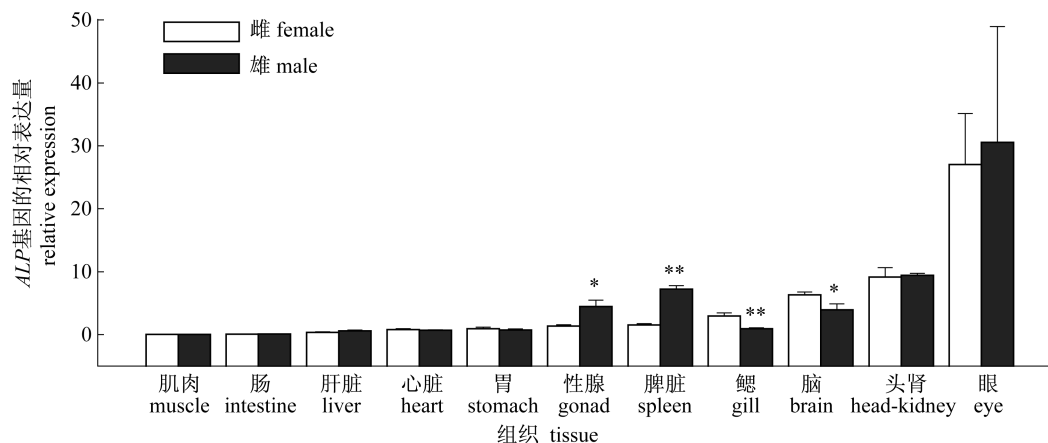


图 5 *LcALP* 基因在大黄鱼雌雄各组织器官中的表达

\* 表示雌性和雄性相同组织中表达存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ); \*\* 表示雌性和雄性相同组织中表达存在极显著性差异 ( $P < 0.01$ )

Fig. 5 Distribution pattern of *LcALP* in the female and male different tissues of large yellow croaker

The significant differences of the same tissues between the female and male are indicated by “\*” ( $P < 0.05$ ) and “\*\*” ( $P < 0.01$ )

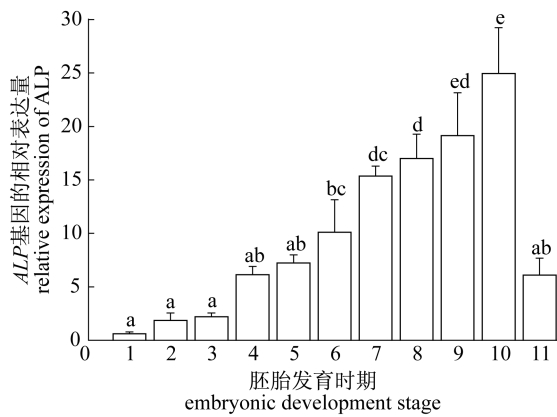


图6 *LcALP* 基因在胚胎发育各时期表达

1. 多细胞期;2. 囊胚期;3. 原肠期;4. 卵黄栓形成期;5. 眼泡出现期;6. 胚孔关闭期;7. 晶体出现期;8. 尾芽期;9. 心跳期;10. 孵出期;11. 初孵仔鱼期;含有相同字母表示各胚胎发育时期 *LcALP* 基因表达水平之间不存在显著性差异 ( $P > 0.05$ )

Fig. 6 The expression pattern of *LcALP* in all stages of embryonic development

1. multiple cells; 2. blastula; 3. gastrula; 4. formation of yolk plug; 5. formation of eye lens; 6. closure of blastopore; 7. appearance of optic vesicles; 8. tail bud; 9. heart pulsation; 10. prehatching; alevin stage; Stages with the same letter indicate no significant difference of *LcALP* gene expression level between the stages of embryonic development

## 2.7 LPS 处理对大黄鱼肌肉细胞系 *LcALP* 基因表达的影响

LPS 处理后,大黄鱼肌肉细胞系 *LcALP* 基因表达水平在 3 h 没有明显变化,而在 6 h 有所降低,到 12 h 表达量最低,与对照组有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),24 h 后恢复至正常水平(图 7)。

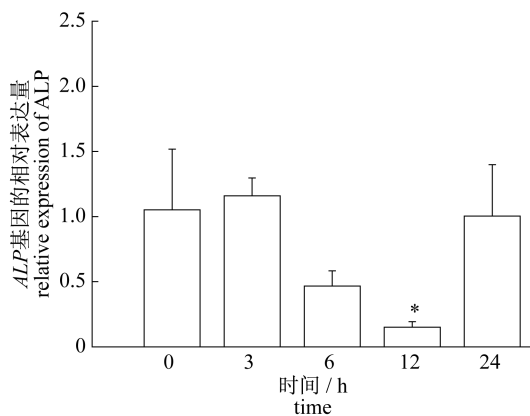


图7 LPS 对大黄鱼肌肉细胞系 *LcALP* 基因表达的影响  
“\*”表示与其他时相比较 *LcALP* 基因表达水平存在显著差异 ( $P < 0.05$ )

Fig. 7 The effect of LPS on *LcALP* gene expression of large yellow croaker muscle cell line

“\*” denotes the significant difference of *LcALP* gene expression compared with other sample time ( $P < 0.05$ )

## 2.8 poly I:C 处理对大黄鱼肌肉细胞系 *LcALP* 基因表达的影响

poly I:C 处理后,大黄鱼肌肉细胞系 *LcALP* 基因表达水平在 3 h 没有明显变化,从 6 h 开始有所升高,在 12 h 表达水平持续上调,至 24 h 表达量达到峰值,显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 8)。

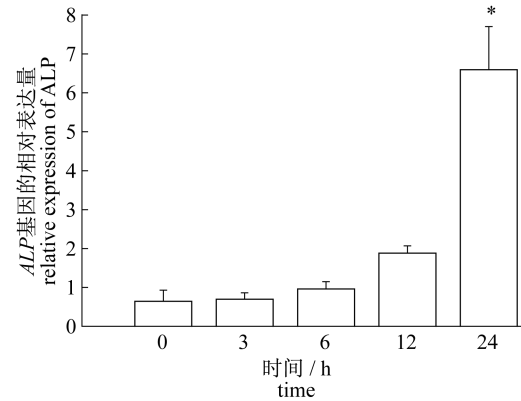


图8 poly I:C 对大黄鱼肌肉细胞系 *LcALP* 基因表达的影响

“\*”表示与其他时相比较 *LcALP* 基因表达水平存在显著差异 ( $P < 0.05$ )

Fig. 8 The effect of poly I:C on *LcALP* gene expression of large yellow croaker muscle cell line  
“\*” denotes the significant difference of *LcALP* gene expression compared with other sample time ( $P < 0.05$ )

## 3 讨论

本实验获得了大黄鱼 *LcALP* cDNA 全长, GenBank 登录号为 AEL33276, 其编码的氨基酸序列与斑点绿河豚 (*Tetraodon nigroviridis*)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)、大西洋鲑、金头鲷 (*Sparus aurata*) 等 ALP 氨基酸序列有较高的一致性 (78% ~ 87%), 具有 ALP 活性中心 Asp-Ser-Ala 三连体序列、与 Mg 和 Zn 离子结合的位点以及一个 GPI 锚定位点等 ALP 家族保守序列。另外, *LcALP* 与鱼类 ALP 聚为一支, 具有 ALP 家族共有的 alkPPc 结构域, 且三维空间结构与哺乳动物 ALP 十分相似, 表明 *LcALP* 具备了碱性磷酸酶家族的基本特征, 也反映 ALP 在进化过程中相对保守。

许多研究表明, *ALP* 基因在鱼类各组织中均有表达, 如田娟<sup>[21]</sup>等发现 *ALP* 基因在大菱鲆各组织均表达, 其中在心脏和肝脏中的表达水平较高。陈晓武等<sup>[24]</sup>克隆了牙鲆 *ALP* 基因 cDNA 全

序列,通过 RT-PCR 检测到该基因在成鱼胃、肝、鳃、皮肤、皮下肌肉、肾等组织中均有表达。本实验雌性和雄性大黄鱼 *LcALP* 基因在各个组织中均有表达,与前人研究结果相似,但是雌性和雄性大黄鱼 *LcALP* 在眼中的表达量均远高于其他组织。视觉器官是鱼类重要的光感受器,在鱼类的摄食、定位、逃避敌害等方面发挥着重要的作用。目前,关于鱼类视觉形成的研究还主要集中在眼睛的形态结构以及生理功能方面,其感光信号通路分子机制的研究还相当薄弱<sup>[25]</sup>。哺乳动物视觉的形成主要与视蛋白有关,当感光时,视色素中的 11-顺视黄醛在光作用下转变成全反视黄醛,并与视蛋白分离,视蛋白激活与其耦联的 G 蛋白,再通过胞内的磷酸化级联反应将光信号放大并通过一系列信号传导途径将信息传递至大脑<sup>[26]</sup>。因此,雌雄大黄鱼 *ALP* 基因在眼中的高表达,很有可能与磷酸化级联反应相关分子的调控有关,但尚需进一步深入研究。

最近, Yang 等<sup>[18]</sup>从斑马鱼中发现 4 种 *ALP* 基因序列,其中 1 种在各组织中都有表达,另外 3 种为肠特异性表达,而文昌鱼早期发育过程中也检测到肠特异性 *ALP* 和非组织特异性 2 种 *ALP* 的存在<sup>[27]</sup>,这表明鱼类 *ALP* 基因的复杂性,是否在大黄鱼中存在多种 *ALP* 基因,还有待进一步研究。另外,雄性 *LcALP* 表达量在性腺和脾脏中明显高于雌性,而在鳃和脑则相反,表明 *LcALP* 在雌雄个体中的生理功能可能有所不同。

*ALP* 基因在脊椎动物胚胎发育的不同时期表达水平和组织特异性有所不同<sup>[13]</sup>。本实验中 *LcALP* 在多细胞期只有少量表达,与小鼠胚胎细胞分裂期出现碱性磷酸酶的表达相符<sup>[28]</sup>。大黄鱼囊胚期和原肠期 *LcALP* 的表达量是多细胞期的 3.05 和 3.60 倍,推测囊胚期碱性磷酸酶活性明显提高。陈晓武等<sup>[14]</sup>利用组织化学的方法也检测到牙鲆 *ALP* 在胚胎原肠期有明显表达,而 Mao 等<sup>[29]</sup>却未检测到文昌鱼囊胚期和原肠期 *ALP* 的特异性表达,提示在不同鱼类的胚胎发育中碱性磷酸酶的表达调控机制有所不同。根据刘家富<sup>[30]</sup>关于大黄鱼胚胎发育时期的划分,从卵黄栓形成期到孵出期为胚体形成的阶段。本实验发现,进入卵黄栓形成期后 *LcALP* 基因表达水平持续地成倍显著升高,其中卵黄栓形成期 *LcALP* 基因水平为原肠期的 2.8 倍,而 *LcALP* 达到峰值的

孵出期则为原肠期的 11.36 倍。胚体形成阶段是鱼类胚胎发育的关键时期,在较短的时间内实现形态、代谢和生理上的巨大变化,这个阶段 *LcALP* 基因水平显著提高表明 *LcALP* 在调节胚体形成过程中体内 DNA、RNA、蛋白质和脂类等物质的代谢以及跨膜运输的调控起着重要作用,以满足胚胎发育的生理需求<sup>[2]</sup>。王书平等<sup>[13]</sup>研究表明,从金鱼受精卵发育至孵化出仔鱼过程中,碱性磷酸酶活性持续显著增加,这与大黄鱼的胚胎发育 *LcALP* 基因水平变化结果一致。*LcALP* 在孵出期达到峰值,表明这一时刻的各种物质与能量代谢达到顶峰,以适应鱼体成型的需要。大黄鱼发育到初卵仔鱼期 *LcALP* 基因水平急剧下降,仅为孵出期的 1/4 的水平,推测是由于仔鱼步入平稳生长期,生物体内 DNA、RNA、蛋白质和脂类等物质代谢整体水平降低所致。Chen<sup>[31]</sup>等的研究也发现,大黄鱼仔鱼阶段肠道中的碱性磷酸酶的活性较低,但随着仔鱼向幼鱼生长和发育,其碱性磷酸酶活性持续上升且逐步达到稳定水平。

同其他脊椎动物一样,鱼类主要通过细胞表面的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 特异地识别病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP),如 LPS、脂蛋白 (lipoprotein)、病原微生物遗传物质核酸等,激活先天性免疫应答,引起细胞因子的释放,上调共刺激分子表达,促进炎症反应发生<sup>[32]</sup>。目前,不同病原微生物引起鱼体血清碱性磷酸酶活性变化的研究已有不少报道,但有关病原模式分子刺激后鱼类细胞 *ALP* 基因表达变化的体外研究相对较少。最近的研究表明,斑马鱼肠特异性碱性磷酸酶经 LPS 刺激后表达水平提高,能够对肠内毒素 LPS 进行脱磷酸化作用,通过 MyD88 信号传导途径,对炎症反应进行负调控<sup>[33]</sup>。在本实验中,LPS 处理大黄鱼肌肉细胞系后 *LcALP* 基因表达水平在 12 h 明显下调,表明 LPS 对 *LcALP* 在一定的阶段抑制了 *LcALP* 的转录表达。葛明峰等<sup>[6]</sup>观察到哈氏弧菌感染大黄鱼后第 1 天和第 7 天,血清中碱性磷酸酶活性均有显著降低,提示鱼类 *ALP* 基因表达调控机制的复杂性。王凤明等<sup>[34]</sup>也发现,在培养基中加入不同浓度的 LPS 后,人牙髓细胞的碱性磷酸酶活性受到抑制,与本实验结果一致。另外,陈萍等<sup>[35]</sup>研究证实,三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 经溶藻弧菌感染



后,其不同组织中 ALP 酶活随着感染时间的延长而降低。poly I:C 是病毒 dsRNA 合成类似物多核糖肌苷酸,被鱼类模式识别受体 TLR3 等识别结合后,激活多种信号分子,诱导 I 型干扰素和大量炎症因子的产生<sup>[36]</sup>。Okada 等<sup>[37]</sup>用 poly I:C 注射小鼠后,血清 ALP 酶活性提高,出现自身抗体和肝内外炎症反应。在本实验中,经 poly I:C 处理后,大黄鱼肌肉细胞系 *LcALP* 基因表达水平持续上调,24 h 表达量达到峰值,显著高于对照组,这表明 *LcALP* 可能在抵御病毒感染的免疫反应中发挥重要作用。目前,有关病毒或病毒类似物刺激大黄鱼引起 ALP 活性变化的研究还未见报道,但在杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 和锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 的研究表明,病毒感染后能够引起血清中 ALP 活性在短时间内明显升高,推测 ALP 在抗病毒感染、机体解毒方面发挥重要作用<sup>[38-39]</sup>。大黄鱼肌肉细胞经 LPS 处理后,*LcALP* 基因水平降低,而 Poly I:C 处理后则明显上调,表明大黄鱼肌肉细胞系对不同病原体(病毒或细菌)免疫应答机制有所不同。

本实验从大黄鱼中克隆得到 *LcALP* 基因的 cDNA 全长,qRT-PCR 结果显示在胚胎发育过程中以及大黄鱼细胞体外抗病原相关分子模式刺激后,*LcALP* 基因的表达量发生了显著变化,表明该基因在大黄鱼胚胎发育调控以及抵御外界病原微生物方面发挥重要作用,为大黄鱼生长发育以及免疫防御分子机制的研究提供了参考资料。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Zhang H, Ye H L. The role of alkaline phosphatase in aquatic animals [ J ]. Hebei Fisheries, 2003, 5 ( 131 ): 12 - 13. [ 张辉, 张海莲. 碱性磷酸酶在水产动物中的作用. 河北渔业, 2003, 5 ( 131 ): 12 - 13. ]
- [ 2 ] Liu Z H, Mou H J, Wang Q Y. Research progress of immune related enzymes in mollusca [ J ]. Marine Fisheries Research, 2003, 24 ( 3 ): 86 - 90. [ 刘志鸿, 牟海津, 王清印. 软体动物免疫相关酶研究进展. 海洋水产研究, 2003, 24 ( 3 ): 86 - 90. ]
- [ 3 ] Meyran J, Graf F. Ultrahistochemical localization of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase and alkaline phosphatase activity in a calcium-transporting epithelium of a crustacean during moulting [ J ]. Histochemistry, 1986, 85 ( 4 ): 313 - 320.
- [ 4 ] de Backer M, McSweeney S, Rasmussen H B, et al. The 1.9 Å crystal structure of heat-labile shrimp alkaline phosphatase [ J ]. Journal of Molecular Biology, 2002, 318 ( 5 ): 1265 - 1274.
- [ 5 ] Whyte M P. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia [ J ]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010, 1192 ( 1 ): 190 - 200.
- [ 6 ] Ge M F, Li S Y, Wang G L. Effect of infection by three pathogenic vibrios on the seven enzymes activity in *Pseudosciaena crocea* [ J ]. Journal of Marine Sciences, 2012, 30 ( 2 ): 74 - 80. [ 葛明峰, 李思源, 王国良. 3 种致病弧菌感染对大黄鱼 7 种酶活性的影响. 海洋学研究, 2012, 30 ( 2 ): 74 - 80. ]
- [ 7 ] Campbell E L, MacManus C F, Kominsky D J, et al. Resolvin E1-induced intestinal alkaline phosphatase promotes resolution of inflammation through LPS detoxification [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107 ( 32 ): 14298 - 14303.
- [ 8 ] Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease [ J ]. Journal of Nippon Medical School, 2010, 77 ( 1 ): 4 - 12.
- [ 9 ] Hahnel A C, Rappolee D A, Millan J L, et al. Two alkaline phosphatase genes are expressed during early development in the mouse embryo [ J ]. Development, 1990, 110 ( 2 ): 555 - 564.
- [ 10 ] Garattini E, Jia Cheng H, Udenfriend S. Cloning and sequencing of bovine kidney alkaline phosphatase cDNA [ J ]. Gene, 1987, 59 ( 1 ): 41 - 46.
- [ 11 ] Xie L P, Wu Y T, Dai Y P, et al. A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored alkaline phosphatase dwells in the hepatic duct of the pearl oyster, *Pinctada fucata* [ J ]. Marine Biotechnology, 2007, 9 ( 5 ): 613 - 623.
- [ 12 ] Nilsen I W, Øverbø K, Olsen R L. Thermolabile alkaline phosphatase from Northern shrimp (*Pandalus borealis*): protein and cDNA sequence analyses [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 129 ( 4 ): 853 - 861.
- [ 13 ] Wang S P, Kong X H, Jiang H X, et al. Changes in activities of acid phosphatase and alkaline phosphatase during embryonic development of goldfish, *Carassius auratus* [ J ]. Fisheries Science, 2011, 30 ( 7 ): 405 - 408. [ 王书平, 孔祥会, 江红霞, 等. 金鱼胚胎发育过程中磷酸酶活性的变化. 水产科学, 2011, 30 ( 7 ): 405 - 408. ]
- [ 14 ] Chen X W, Shi Z Y, Gu Y F. The expression pattern

- and function of alkaline phosphatase during the metamorphosis of *Paralichthys olivaceus* [ J ]. Periodical of Ocean University of China, 2007, 37 ( 6 ): 894 - 898. [ 陈晓武, 施志仪, 顾一峰. 牙鲆发育中 ALP 基因表达图式及功能分析. 中国海洋大学学报, 2007, 37(6): 894 - 898. ]
- [ 15 ] Zhang J P, Lin J C, Xie J J, *et al.* Purification and some characterization of alkaline phosphatase from grass carps (*Ctenopharyngodon idellus*) [ J ]. Journal of Xiamen University: Natural Sciences, 2005, 44 ( 5 ): 684 - 687. [ 张继平, 林建成, 谢进金, 等. 草鱼碱性磷酸酶的分离纯化与部分性质研究. 厦门大学学报: 自然科学版, 2005, 44(5): 684 - 687. ]
- [ 16 ] Wang H Q, Tang D Y, Zhao Y R, *et al.* Effects of dietary achyranthes bidentata polysaccharide on immunity and antioxidant function of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [ J ]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37 ( 2 ): 351 - 357. [ 王红权, 唐德约, 赵玉蓉, 等. 牛膝多糖对草鱼免疫和抗氧化功能的影响. 水生生物学报, 2013, 37(2): 351 - 357. ]
- [ 17 ] Guo W R, Liu L P, Zhang Z F, *et al.* The impact of vibrio anguillarum challenging on non-specific immune responses of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) [ J ]. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20 ( 1 ): 89 - 95. [ 郭伟荣, 刘利平, 张宗锋, 等. 感染鳃弧菌对花鲈非特异性免疫功能的影响. 上海海洋大学学报, 2011, 20 ( 1 ): 89 - 95. ]
- [ 18 ] Yang Y, Wandler A M, Postlethwait J H, *et al.* Dynamic evolution of the LPS-detoxifying enzyme intestinal alkaline phosphatase in zebrafish and other vertebrates [ J ]. Frontiers in Immunology, 2012, 3: 314.
- [ 19 ] Leong J S, Jantzen S G, von Schalburg K R, *et al.* *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome [ J ]. BMC Genomics, 2010, 11 ( 1 ): 279.
- [ 20 ] Chen X W, Shi Z Y. cDNA sequence analysis and tertiary structure prediction of alkaline phosphatase from (*Paralichthys olivaceus*) [ J ]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 23 ( 6 ): 442 - 449. [ 陈晓武, 施志仪. 牙鲆碱性磷酸酶 cDNA 序列分析与蛋白质高级结构预测. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(6): 442 - 449. ]
- [ 21 ] Tian J, Shi Z Y. Expression of alkaline phosphatase (ALP) gene in tissues of *Scophthalmus maximus* and relationship between thyroid hormone and alkaline phosphatase [ J ]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18 ( 1 ): 208 - 213. [ 田娟, 施志仪. 碱性磷酸酶在大菱鲆不同组织的表达及其与甲状腺激素的关系. 中国水产科学, 2011, 18 ( 1 ): 208 - 213. ]
- [ 22 ] Xu L, Liu B, Xie J, *et al.* Effect on mannose oligosaccharides on growth performance, immunity and Hsp70 expression of juvenile crucian carps (*Carassius auratus gibelio*) [ J ]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36 ( 4 ): 656 - 664. [ 徐磊, 刘波, 谢骏, 等. 甘露寡糖对异育银鲫生长性能、免疫及 HSP70 基因表达的影响. 水生生物学报, 2012, 36(4): 656 - 664. ]
- [ 23 ] Liu J F, Liu Z K. Outlook for large yellow croaker (*Larimichthys crocea* Richardson) industry in Mindong [ J ]. Modern Fisheries Information, 2009, 23 ( 12 ): 3 - 5. [ 刘家富, 刘招坤. 福建闽东大黄鱼 *Larimichthys crocea* (Richardson) 产业展望. 现代渔业信息, 2009, 23(12): 3 - 5. ]
- [ 24 ] Chen X W, Shi Z Y, Gu Y F. The Expression pattern and function of alkaline phosphatase during the metamorphosis of *Paralichthys olivaceus* [ J ]. Periodical of Ocean University of China, 2008, 37 ( 6 ): 894 - 898. [ 陈晓武, 施志仪, 顾一峰. 牙鲆发育中 ALP 基因表达图式及功能分析. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2008, 37(6): 894 - 898. ]
- [ 25 ] Li Z Q, He S P. Progress on molecular evolution of vertebrate opsin genes [ J ]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33 ( 6 ): 1193 - 1197. [ 李志强, 何舜平. 脊椎动物视蛋白基因分子进化的研究进展. 水生生物学报, 2009, 33(6): 1193 - 1197. ]
- [ 26 ] Chen M M, Yu L, Jin W, *et al.* Advances in evolution of mammalian visual coneopsin genes [ J ]. Chinese Science Bulletin, 2010, 55 ( 9 ): 739 - 745. [ 陈萌萌, 于黎, 靳伟, 等. 哺乳动物视锥蛋白基因进化研究进展. 科学通报, 2010, 55 ( 9 ): 739 - 745. ]
- [ 27 ] Mao B Y, Lin Y, Zhang H W. The expression of two alkaline phosphatases in amphioxus embryo and larva [ J ]. Journal of Shandong University: Natural Sciences, 2001, 36 ( 3 ): 336 - 340. [ 毛炳宇, 李艳, 张红卫. 文昌鱼早期发育中两种碱性磷酸酶的表达. 山东大学学报: 自然科学版, 2001, 36 ( 3 ): 336 - 340. ]
- [ 28 ] Izquierdo L, Lopez T, Marticorena P. Cell membrane regions in preimplantation mouse embryos [ J ]. Journal of Embryology and Experimental

- Morphology,1980,59(1):89-102.
- [29] Mao B Y, Lin Y, Zhang H W. Expression pattern of alkaline phosphatase in amphioxus embryo and larva [J]. *Developmental and Reproductive Biology*, 2000,9(1):21-26.
- [30] Liu J F. Study on the development of *Pseudosciaena crocea* (Richardson) embryo and the morphological characteristics and the ecology of its larval, juvenil fish[J]. *Modern Fisheries Information*,1999,14(7):20-24. [刘家富. 人工育苗条件下的大黄鱼胚胎发育及其仔、稚鱼形态特征与生态的研究. 现代渔业信息,1999,14(7):20-24.]
- [31] Chen B N, Qin J G, Kumar M S, *et al.* Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae [J]. *Aquaculture*, 2006,260(1-4):264-271.
- [32] Ao J Q, Chen X H. Research progress on pattern-recognition receptors in fish[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*,2012,24(9):1049-1054. [敖敬群, 陈新华. 鱼类模式识别受体的研究进展. 生命科学,2012,24(9):1049-1054.]
- [33] Bates J M, Akerlund J, Mittge E, *et al.* Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota[J]. *Cell Host and Microbe*,2007,2(6):371-382.
- [34] Wang F M, Hu T, Zhou X D. Proliferation and ALPase activity of human dental pulp cells in response to lipopolysaccharide *in vitro*[J]. *Shanghai Journal of Stomatology*,2005,14(1):77-80. [王凤明,胡涛,周学东. 脂多糖对人牙髓细胞增殖和碱性磷酸酶活性的影响. 上海口腔医学,2005,14(1):77-80.]
- [35] Chen P, Wang Q Y, Li J, *et al.* Effects on lysozyme and phosphatase activities of *Portunus trituberculatus* infected by *Vibrio alginolyticus* [J]. *Progress in Fishery Sciences*,2009,30(2):78-82. [陈萍,王清印,李健,等. 溶藻弧菌对三疣梭子蟹溶菌酶和磷酸酶活性的影响. 渔业科学进展,2009,30(2):78-82.]
- [36] Boltaña S, Roher N, Goetz F W, *et al.* PAMPs, PRRs and the genomics of gram negative bacterial recognition in fish [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, 35 ( 12 ): 1195-1203.
- [37] Okada C, Akbar S, Fazle M, *et al.* Early development of primary biliary cirrhosis in female C57BL/6 mice because of poly I: C administration [J]. *Liver International*,2005,25(3):595-603.
- [38] Liu W, Qian D, Pan Q Q, *et al.* Studies on pathogenicity of white spot syndrom virus and effect on hemolymph enzymes activities changes in mud crab *Scylla serrata* ( Forskal ) [ J ]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33 ( 6 ): 1112 - 1117. [刘问,钱冬,潘清清,等. WSSV对锯缘青蟹的致病性及血清酶指标影响. 水生生物学报,2009,33(6):1112-1117.]
- [39] Wang J Y, Guo Z X, Feng J, *et al.* Changes of immune factors in serum of *Halotis diversicolor* reeve infected by virus [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*,2005,12(3):344-347. [王江勇,郭志勋,冯娟,等. 病毒感染后杂色鲍部分血清免疫因子的变化. 中国水产科学,2005,12(3):344-347.]

## Molecular cloning and expression analysis of alkaline phosphatase gene in *Larimichthys crocea*

FENG Jianjun, YAO Zhigang, ZHANG Ziping, ZHONG Enhui, ZHUANG Daohua,  
LIN Peng, GUO Songlin, GUAN Ruizhang, WANG Yilei\*

(Engineering Research Centre of Eel Modern Technical Industry, Ministry of Education;  
Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture;  
Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** Alkaline phosphatase (ALP) is a widely-distributed phylogenetic phosphomonoesterase involved in the precise regulation of the animal biological metabolism. In this study, an ALP gene, *LcALP*, was cloned for the first time from *Larimichthys crocea*. Its full-length cDNA sequence is 2 345 bp, with a 1 629 bp open reading frame encoding a protein of 543 aa. qRT-PCR revealed the expression of *LcALP* could be detected in all adult tissues examined, with higher expression in the eye and head kidney of both sexes. Compared with the male, the expression level of *LcALP* gene from female was significantly higher in the gill and brain whereas much lower in the gonad and spleen. The low levels of *LcALP* were observed during the multiple cells, blastula, and gastrula stages. The levels increased significantly at yolk plug stage and peaked at prehatching stage, and then declined obviously at the alevin stage. After treatment with LPS, the expression level of *LcALP* in muscle cell line began to decrease at 6 h and was down-regulated significantly at 12 h. When large yellow croaker muscle cell lines were treated with poly I:C, the expression level of *LcALP* continuously increased to the peak at 24 h. Our results suggested that *LcALP* might play important roles as a regulator during the embryonic development and as an immune factor under stimulation of different pathogen-associated molecular patterns.

**Key words:** *Larimichthys crocea*; alkaline phosphatase (ALP); lipopolysaccharide (LPS); embryonic development

**Corresponding author:** WANG Yilei. E-mail: ylwang@jmu.edu.cn