

盐度和甜菜碱对鲈鱼 BHMT mRNA 表达的影响

钱云霞*, 宋娟娟

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶(BHMT, EC 2.1.1.5)催化甜菜碱的甲基转移给高半胱氨酸(Hcy), 而分别生成二甲基甘氨酸和蛋氨酸。利用 RT-PCR 和 SMART RACE 的方法从鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)肝脏中克隆了 BHMT 全长 cDNA。该序列全长 1461 bp, 5'端非翻译区 72 bp, 3'端非翻译区 183 bp, 开放阅读框 1206 bp, 可编码一个由 401 个氨基酸组成的蛋白质, 该蛋白质相对分子质量为 44.32 kD, 等电点为 7.21。氨基酸序列分析表明, BHMT 具有较高的保守性, 鲈鱼 BHMT 与人、小鼠等 9 个物种的同源性为 77%~93%, 其中与黄鲈(*Perca flavescens*)同源性最高, 为 93%。用 RT-PCR 分析 BHMT 基因在 10 个组织中的表达结果表明, 只有在肝、肠和肾中有较高的表达。RT-PCR 和定量 PCR 表明, 鲈鱼从盐度 25 的海水转入盐度 12 的海水后, 肝、肠和肾 BHMT 基因表达量有增加, 而将鲈鱼从盐度为 25 的海水转入盐度为 29 的海水后, 肝、肠和肾的 BHMT 基因表达则减少。腹腔注射甜菜碱可增加鲈鱼 BHMT 基因在肝、肠和肾三个组织中的相对表达量。这些结果表明, 甜菜碱可诱导鲈鱼 BHMT 基因表达, 而 BHMT 在适应鱼类环境渗透压变化中起重要作用。

关键词: 鲈鱼; BHMT; 克隆; 组织表达; 盐度

中图分类号: Q785; Q959.499; Q516 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2011)03-0277-08

Effects of salinity and betaine on BHMT mRNA expression in *Lateolabrax japonicus*

QIAN Yun-Xia*, SONG Juan-Juan

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Betaine homocysteine methyltransferase (BHMT, EC 2.1.1.5) catalyzes the transfer of a methyl group from betaine to homocysteines (Hcy) to form dimethylglycine and Met, respectively. A full-length cDNA of the BHMT in *Lateolabrax japonicus* was amplified using RT-PCR and SMART RACE methods. The cDNA of the BHMT in *L. japonicus* is 1461 bp in size, with 72 bp 5'-UTR, 183 bp 3'-UTR and 1206 bp ORF, encoding a protein of 401 amino acids with a molecular weight of 44.32 kD and pI 7.21. The sequence analysis indicated that the deduced amino acid sequence of BHMT shared high identity (77% - 93%) with nine other species; the highest was 93% with *Perca flavescens*. Semi-quantitative RT-PCR was used to characterize the expression of BHMT in ten tissues including muscle, heart, eye, brain, gill, liver, intestine, kidney, adipose tissue and spleen. The results showed that BHMT is only expressed in the liver, intestines and kidney. BHMT mRNA in these three tissues declined after the fish were transferred from sea water to a higher salinity environment and induced when transferred to a lower salinity environment. BHMT gene in liver, intestine and kidney can also be induced after intraperitoneal injection of betaine. Our results show that betaine can induce the transcription of BHMT in fish, and BHMT play pivotal roles in adaptation to osmotic change.

Key words: *Lateolabrax japonicus*; BHMT; Clone; Tissues Expression; Salinity

甜菜碱化学名为 N-三甲基甘氨酸, 在生物体内它是胆碱代谢的中间产物, 广泛存在于各组织中, 在细胞的线粒体中生成后释放到胞浆。由于甜菜碱的三个甲基都是有效的活性甲基, 因而它是体内最

有效的甲基供体之一(Wettstein et al, 1998)。同时, 甜菜碱还是重要的渗透压调节剂。研究表明, 哺乳动物的肝脏和肾脏细胞为保持细胞体积的稳定会在细胞高渗收缩时累积甜菜碱, 在细胞低渗肿胀时

收稿日期: 2010-08-26; 接受日期: 2010-11-22

基金项目: 国家自然科学基金(30671608); 浙江省自然科学基金(M303345); 宁波市自然科学基金(2006A610088)。

*通讯作者(Corresponding author), Tel: +86-574-87600169, E-mail: qianyunxia@nbu.edu.cn

第一作者简介: 钱云霞(1965—), 女, 副教授, 硕士生导师, 主要从事水产动物生物化学与分子生物学研究

释放甜菜碱(Garcia & Burg, 1991; Wettstein et al, 1998)。在鱼类,甜菜碱可以使大西洋鲑(*Salmo salar*)从淡水进入海水时减少盐度变化的刺激,当鱼类的饵料中含有甜菜碱时,肌肉含水率降低,保持渗透压平衡的能力提高(Junnila, 2000)。目前,甜菜碱在渗透压调节中的作用已经在许多生物中得到证实,包括微生物、植物和其它动物(Polat & Beklevik, 1998.)。

体内甜菜碱的代谢分解主要是通过甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶(Betaine homocysteine methyltransferase, BHMT, EC 2.1.1.5)催化, BHMT是一种 Zn^{2+} 依赖的巯基甲基转移酶(Neece et al, 2000),将甜菜碱的一个甲基转移给高半胱氨酸后分别生成二甲基甘氨酸和蛋氨酸(甲硫氨酸)(Sandra et al, 2000),从而降低高半胱氨酸(也叫同型半胱氨酸)的浓度,因为高浓度的高半胱氨酸可引发心血管疾病(Pajares & Perez-Sala, 2006)。虽然高半胱氨酸可以通过转硫作用生成胱硫醚而排出体外,但从节约蛋氨酸的角度出发,由BHMT催化的高半胱氨酸的再甲基化在蛋氨酸循环中尤为重要(Pajares & Perez-Sala, 2006)。高半胱氨酸还可由蛋氨酸合成酶(methionine synthetase, MS, EC 2.1.1.13)催化生成蛋氨酸,该酶与辅酶B12结合,催化N5-甲基四氢叶酸的甲基转移到高半胱氨酸上生成蛋氨酸,因而叶酸缺乏时补充甜菜碱是治疗人类高半胱氨酸血症的重要手段(Schäfer et al, 2007)。BHMT基因序列已在许多生物中被报道(Fisher et al, 2002),但是鱼类BHMT到目前为止仅见于黄鲈(*Perca flavescens*)、金头鲷(*Sparus aurata*)、大西洋鲑、斑马鱼(*Danio rerio*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)等。

鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*),属鲈形目鮨科鲈属,是一种广盐性、肉食性的鱼类,因其肉质细美,营养丰富,广受国内外市场青睐,是我国沿海主要海水养殖鱼类之一。本实验通过PCR和RACE技术克隆了鲈鱼BHMT基因全长,并对其进行了结构分析,通过RT-PCR方法检测了BHMT基因在鲈鱼组织中的分布,同时检测了盐度和甜菜碱对鲈鱼各组织中BHMT基因表达的影响,为今后研究BHMT功能及鱼类渗透压调节机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 总RNA的提取和cDNA的合成

克隆基因所用鲈鱼取自浙江象山黄避岙养殖

场,属厦门沿海的南方种群,活体解剖,快速取出肝脏,用Trizol法提取总RNA,用Thermo公司的ND-1000型微量紫外分光光度计测定其浓度,并取1 μ g总RNA按照TaKaRa公司的PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明书逆转录第一链cDNA。

1.2 核心片段的获取

据已知大西洋鲑、金头鲷、牙鲆、斑马鱼和黄鲈BHMT保守序列设计引物BHMT F1: 5'GTCATGCAGACNTTCACYTTCT-3'和BHMT R1: 5'-GGTGGCYTCCTTSTGCT GC-3',以鲈鱼肝脏cDNA为模板扩增BHMT基因的中间片段。引物均由Generay Biotech公司合成。PCR条件如下: 94 预变性4 min; 94 30 s, 57~55 30 s, 72 1 min, 各1个循环; 94 30 s, 54 30 s, 72 1 min, 34个循环; 最后72 延伸5 min。使用Beyotime公司生产的凝胶回收试剂盒回收PCR产物,然后与pMD18-T载体进行连接,转化*E. coli* DH5 α 感受态细胞后,于含氨卞青霉素(终浓度100 μ g/m L)的LB琼脂平板上37 过夜培养,筛选阳性克隆菌株,经pMD18-T载体通用引物PCR鉴定,正确的克隆要送上海Invitrogen生物有限公司测序。

1.3 3'RACE扩增和5'RACE扩增

RACE PCR扩增按照Clontech公司的SMART™ RACE cDNA Amplification Kit的说明书进行。取1 μ g肝脏总RNA按照说明书合成3'Ready cDNA和5'Ready cDNA。根据获得的中间片段序列,设计特异性引物3'RACE P1: 5'-CCTGTGACCTGGCAGAG AAGTAGC-3'和5'RACE P1: 5'-CCTGATGTGGTAAGGCTCAAATCCGC A-3',分别以3'READY cDNA和5' READY cDNA为模板,3'RACE P1和5'RACE P1引物,以及试剂盒提供的通用引物UPM进行3'RACE和5'RACE第一轮PCR反应。PCR反应条件如下: 94 30 s, 72 3 min, 5个循环; 94 30 s, 70 30 s, 72 3 min, 5个循环; 94 30 s, 68 30 s, 72 3 min, 25个循环; 最后72 延伸8 min。以第一轮PCR产物稀释50倍作为模板,设计巢氏引物3'RACE P2: 5'-CTGCTGCGGATTTGAGCCTTACC-3'和5'RACE P2: 5'-ATGGATGGGCACTTGGGACGACC-3'。再以3'RACE P2、5'RACE P2和试剂盒提供的引物Nest-UPM分别进行第二轮PCR扩增。PCR反应条件如下: 预变性94 3 min; 94 30 s, 68 30 s, 72

3 min, 30 个循环; 最后 72 延伸 10 min。产物的回收、测序方法同 1.2。

1.4 鲈鱼 BHMT 基因 cDNA 序列和蛋白质序列的分析

获得鲈鱼 BHMT cDNA 全长序列后, 用 Bioedit 软件推测其编码的氨基酸序列, 在 NCBI 中用 BLAST 进行同源性检索, 并用 MEGA 4 中的邻位相联法(Neighbor-joining, NJ)构建 BHMT 氨基酸序列系统进化树。构建系统树所用动物及其 BHMT 序列号如下: 黄鲈(*Perca flavescens*, ABU63967)、金头鲷(*Sparus aurata*, ABF06673)、大西洋鲑(*Salmo salar*, NP_001133157)、斑马鱼(*Danio rerio*, NP_001012498)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*, ABM88795)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, NP_001088416)、人(*Homo sapiens*, NP_001704)、黑猩猩(*Pan troglodytes*, XP_517686)、小鼠(*Mus musculus*, NP_057877)、牛(*Bos taurus*, NP_001011679)。

1.5 盐度对鲈鱼 BHMT 表达的影响

盐度实验在室内白色圆桶内进行, 每桶水体积为 100 L, 水温(25±0.1) °C, pH 7.2±0.1, 期间不间断充气, 实验用鲈鱼平均体重 120 g, 实验选取 15 条平均体重为 120 g 的鲈鱼, 分成 3 组, 实验海水盐度为 25±0.1。实验开始后, 高盐组: 逐步换入部分曝气人工高盐水 24 h 后盐度升至 29; 低盐组: 换入部分曝气自来水 24 h 后盐度降为 12; 对照组: 换取部分海水盐度保持在 25。再经过 5 h 后, 各组取 5 条鲈鱼。实验期间不投饵, 没有鲈鱼死亡。用 Sigma 公司生产的 MS-222(1:2000)麻醉后快速取出肌肉、心、眼、脑、鳃、肝、肠、肾、脂、脾等 10 个组织, 提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, RT-PCR 检测实验组和对照组鲈鱼各组织 BHMT 基因的表达。RT-PCR 跨内含子引物为: BHMT F2: 5'-TGTGACCTGGCACGAGAAGTAG-3'; BHMT R2: 5'-TGTGGTAAGGCTCAAATC CGCA-3', PCR 产物长度为 610 bp。以 18S 作为内参对照, 引物为 18S F: 5'-GTAGTTCCGACCATAAACGATGCC-3'; 18S R: 5'-AGAAGTTGGACGCCGACCGCAC-3', PCR 产物长度为 373 bp。18S 的扩增条件为: 预变性 94 °C, 4 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 28 个循环; 72 °C 10 min。BHMT 基因的扩增条件为: 预变性 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 55 °C 50 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。用 Gel-Pro Analyzer 4 凝胶定量分析软件分析电泳图片, 求得的 BHMT 基因与

18S PCR 产物量的比值, 并用此值代表 BHMT 基因 mRNA 的相对表达量。

Real-Time Quantitative PCR 检测盐度对鲈鱼肝、肠和肾 BHMT mRNA 表达的影响。取各组鲈鱼肝、肠和肾 1 μg 总 RNA 按照 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ RT Reagent Kit 说明书逆转录第一链 cDNA。BHMT 的 Real-Time Quantitative PCR 引物为: BHMT F3: 5'-CTGGGGCACAAATCAACGAG-3' 和 BHMT R3: 5'-ATGTCTCCCTCTGGTCCGATG-3'。扩增条件为: 95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 56 °C 30 s, 72 °C 20 s, 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, PCR 产物长度为 295 bp。作为内参对照 β-actin 的引物为 β-actin F: 5'-TGTGCAAAGCCGATTCG-3' 和 β-actin R: 5'-CCTCTCTTGCTCTGGGCTTCA-3', PCR 产物长度为 142 bp。扩增条件为: 95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 56 °C 30 s, 72 °C 20 s, 40 个循环。扩增在 Rotor-Gene 6000 荧光定量 PCR 仪上进行。Real-Time Quantitative PCR 结束后对扩增产物进行熔解曲线分析, 以确保特异性扩增, 根据标准曲线计算样品中 BHMT 基因 mRNA 的拷贝数。设定对照组 BHMT 在肝脏中的表达量为 1, 根据 BHMT 在各组中的表达相对量作图。实验结果用 SPSS 统计软件进行 T test 检验, P<0.05 表示差异有显著性。

1.6 甜菜碱对鲈鱼肝、肠和肾 BHMT 基因表达的影响

鲈鱼大小和养殖条件同 1.5 对照组, 甜菜碱 (Sigma 公司) 以 PBS 为溶剂, 注射浓度为: 400 mg/kg 体重, 注射量为 0.1 mL, 另设 PBS 对照组。鲈鱼用 MS-222 麻醉后腹腔注射。实验期间鲈鱼生活状态良好, 无死亡。注射 5 h 麻醉后解剖鲈鱼, 实验组和对照组各 4 条鲈鱼, 取肝、肠和肾组织, 用 Real-Time Quantitative PCR 检测甜菜碱对鲈鱼肝、肠和肾 BHMT 基因表达的影响, 具体方法同 1.5。

2 结果

2.1 鲈鱼 BHMT 全长 cDNA 的克隆和序列分析

利用兼并引物 BHMT F1 和 BHMT R1 从鲈鱼肝脏 cDNA 中扩增得到长度为 954 bp 的片段, 与预期大小相符, PCR 产物克隆测序后经 BLAST 分析确认为鲈鱼 BHMT 的核心序列。根据该核心序列设计巢式 PCR 引物, 分别克隆得到 517 bp 的 3'RACE 产

物和 1151 bp 的 5'RACE 产物。将获得的 3'、5'末端序列与核心序列拼接最终得到 BHMT 基因的全长 cDNA 序列。结果表明, BHMT 基因 cDNA 序列全长为 1461 bp, 含一个 1206 bp 的开放阅读框, 73~75 bp 处为起始密码子 ATG, 1276~1278 bp 处为终止密码子 TGA, 编码一个由 401 个氨基酸组成的蛋白质(图 1), 典型加尾信号 AATAAA 位于 polyA 起点上游 14 bp。http://ca.expasy.org/tools/线软件分析表明, 该蛋白质相对分子质量为 44.32 k、等电点为 7.21, 已经递交 GenBank, 序列号为: HQ008859。

2.2 BHMT 的同源性比较和系统发育分析

将鲈鱼与黄鲈等十个物种的 BHMT 进行氨基酸序列 BLAST 分析后发现, 鲈鱼与同为鲈形目的黄鲈同源性最高, 为 93%; 与鲈形目的金头鲷、鲑形目的大西洋鲑、鲤形目的斑马鱼、鲾形目的牙鲆也都有较高的同源性, 分别为 91%、83%、82%和 80%;

与非洲爪蟾的同源性为 80%; 与人、黑猩猩、牛及小鼠的同源性分别为 79%、79%、78%和 77%。用 http://www.expasy.ch/prosite/分析 BHMT 配体结合位点, 发现三个(210、292、293)可以与 Zn^{2+} 结合的半胱氨酸残基位点, 将鲈鱼 BHMT 的氨基酸序列与人、小鼠和黄鲈氨基酸序列比对分析发现这三个半胱氨酸残基位点对应于人和小鼠的第 217、299 和 300 位(图 2)。

用软件 MEGA 4 中的邻位相联法(Neighbor-joining, NJ)构建 BHMT 氨基酸序列系统进化树(图 3), 其结果表明, 整棵树分成两簇: 哺乳类和两栖类形成一簇, 鱼类独立成簇。鲈鱼与黄鲈、金头鲷有着较近的亲缘关系, 而与西洋鲑、斑马鱼及牙鲆亲缘关系较远, 这与传统分类学上结果相符, 因为鲈鱼、金头鲷、黄鲈同属鲈形目。

```

ACTCTCTGGGTCAAAAGAAGTGGCTCGCTGTTACCAAGCGCTTAGTTCGCAACTGAAACTGGGAAAAAGAG 72
ATGGCACCTGTCAAGAAGGGTATCCTTGAGCGTCTGAATGCTGGGGAGGTGGTGATTGGCGATGGAGGCTTT 144
M A P V K K G I L E R L N A G E V V I G D G G F 24
GTGTTTGTCTGGAGAAGCGGGGTATGTGAAGGCCGGCCATGGACTCCTGAGGCTACTGTACACACCCCT 216
V F A L E K R G Y V K A G P W T P E A T V T H P 48
GAGGCTGTGGCGAGCTGCACAGGGAGTTCCTGAGGCCAGGATCTAACATCATGCAGACATTCACGTTCTAC 288
E A V R Q L H R E F L R A G S N I M Q T F T F Y 72
GCCAGTGATGACAAACTGGAGAAGTGGGTCAGACCTTGAAGATCTCTGGGGCACAATCAACGAGGCAGCT 360
A S D D K L E N W G Q T L K I S G A I N E A A 96
TGTGACCTGGCAAGGGAAGTAGCCAGTGAAGGAGATGCACTGGTAGCCGGCGGAGTGAGTGCAGACTCCATCC 432
C D L A R E V A S E G D A L V A G G V S Q T P S 120
TACCTGAGCTCAAGAGCGAGACGGAAAGTGAAGGCCATCTTCAAGAAGCAGCTGGAGGTGTTTCAAGAAG 504
Y L S C K S E T E V K A I F K K Q L E V F M K K 144
AACGTGGATTTCCTGATTGCTGAGTACTTTGAGCATGTTGAGGAGCCAGAGTGGCCGTCAGGTTACTGAAG 576
N V D F L I A E Y F E H V E E A E W A V Q V L K 168
ACCAGCGGAAGCCTGTGGCTGTTCTATGTGCATCGGACCAGAGGAGACATGCACGGCGTTTCACCTGGA 648
T S G K P V A A S M C I G P E G D M H G V S P G 192
GAGTGTGCTGTGAGGCTGGTGAAGCCGGTGCCAGATTGTGGGAGTCAACTGCCACTTTGACCCCATGACC 720
E C A V R L V K A G A Q I V G V N C H F D P M T 216
TGTGTGAAGACTGTCAAGATGATGAAGGAAGGAGTGGAGAAGGCCGGGCTTAAGGCTCACTACATGTTGCG 792
C V K T V K M M K E G V E K A G L K A H Y M V Q 240
CCACTTGCTTCCACACCCCGACTGCAACTGTGAGGATTTCATCGACTGCCAGAATTCCTTCCGCTTCCGCTA 864
P L A F H T P D C N C Q G F I D L P E F P F A L 264
GAGCCAGGATCCTGACCCGCTGGGACATGCACACATACGCCAGAGGCGCTACAAGGTTGGCATCAGATAC 936
E P R I L T R W D M H T Y A R E A Y K V G I R Y 288
ATTGGAGGCTGCTGTGGGTTTGTAGCCTTACCACATCAGGGCTCTGACAGGAGCTGGCCCTGAGAGAGGG 1008
I G G C C G F E P Y H I R A L T E E L A P E R G 312
ATAATGCCCCCTGGCTCAGAGAAGCATGGAATGTGGGGTGTGGTCTGGAGATGCACACCAAAACCTGGGTC 1080
I M P P G S E K H G M W G A G L E M H T K P W V 336
AGAGCCAGGGCCCGCTGACTACTGGGAGCAACTCTTCCCGCTCGGTCGTCCTCAAGTGGCGCTCCATG 1152
R A R A R R D Y W E Q L L P A S G R P K C A S M 369
TCCACACAGAAGGCTGGGGCGTGACCAAGGGCCACGCCGACTGCTACAGCACAAGAGGCCACCCACCACC 1224
S T P E G W G V T K G H A D L L Q H K E A T T T 384
CAGGAAATGAAGCAGCTGTGGAGAAGCAGAAGAAGGCCAAGTCTCTGCGTGAGTGAGGCAGAGCTAGAAG 1296
Q E M K H V L E K Q K K A K S S A * 401
GAGAATCTGTTAACAGGAGAGGGACGAGGGGAAGGAGTCTTTCGAGTTCAGTTTGGAGATAAAAAAGCACT 1368
GGTAACAGCGATGCTCCAGTTGTGGAGTATTATGTAACCCCAAAACAATAAACTGAGTTTGTAAACAAAAA 1440
AAAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAA 1461

```

图 1 鲈鱼 BHMT 全长 cDNA 序列及其编码的氨基酸

Fig. 1 The full-length cDNA and deduced amino acid sequence of BHMT from *Lateolabrax japonicus*
星号: 终止密码子; 阴影: 加尾信号。The asterisk (*) indicates stop codon, the shadow indicates poly (A) signals.

		10	20	30	40	50	
人 <i>H. sapiens</i>	MPPVGGKKAK	KGILERLNAG	EIVIGDGGFV	FALEKRGYVK	AGPWTPEAAV		50
小鼠 <i>M. musculus</i>	MAPVAGKKAK	KGILERLNAG	EVIIGDGGFV	FALEKRGYVK	AGPWTPEAAV		50
黄鲈 <i>P. flavescens</i>	MAPG-----K	KGIIERLNAG	EVIIGDGGFV	FALEKRGYVK	AGPWTPEASV		45
鲈鱼 <i>L. japonicus</i>	MAPV-----K	KGILERLNAG	EVIIGDGGFV	FALEKRGYVK	AGPWTPEATV		45
		60	70	80	90	100	
人 <i>H. sapiens</i>	EHPEAVRQLH	REFLRAGSNV	MQTFTFYASE	DKLENRGNVY	LEKISGQEVN		100
小鼠 <i>M. musculus</i>	EHPEAVRQLH	REFLRAGSNV	MQTFTFYASE	DKLENRGNVY	AEKISGQKVN		100
黄鲈 <i>P. flavescens</i>	THPEAVRQLH	REFLRAGSNV	MQTFTFYASD	DKLENRG--Q	NLRISGVQIN		93
鲈鱼 <i>L. japonicus</i>	THPEAVRQLH	REFLRAGSNI	MQTFTFYASD	DKLENWG--Q	TLKISGAQIN		93
		110	120	130	140	150	
人 <i>H. sapiens</i>	EAACDIARQV	ADEGDALVAG	GVSQTPSYLS	CKSETEVKKV	FLQQLEVFEMK		150
小鼠 <i>M. musculus</i>	EAACDIARQV	ADEGDALVAG	GVSQTPSYLS	CKSEVEVKKI	FRQQLEVFEMK		150
黄鲈 <i>P. flavescens</i>	EAACDLAREV	ASEGDMVAG	GVCQTPSYLS	CKSEIEVKAI	FKKQLEVFEMK		143
鲈鱼 <i>L. japonicus</i>	EAACDLAREV	ASEGDMVAG	GVSQTPSYLS	CKSETEVKAI	FKKQLEVFEMK		143
		160	170	180	190	200	
人 <i>H. sapiens</i>	KNVDFLIAEY	FEHVVEAVWA	VETLIASGKP	VAAATMCIGPE	GDLHGVPPGE		200
小鼠 <i>M. musculus</i>	KNVDFLIAEY	FEHVVEAVWA	VEALKASGKP	VAAATMCIGPE	GDLHGVPPGE		200
黄鲈 <i>P. flavescens</i>	KNVDFLIAEY	FEHVVEAEWA	VQVLKTSGKP	VAAALCIGPE	GDMHGVSPGE		193
鲈鱼 <i>L. japonicus</i>	KNVDFLIAEY	FEHVVEAEWA	VQVLKTSGKP	VAAATMCIGPE	GDMHGVSPGE		193
		210	220	230	240	250	
人 <i>H. sapiens</i>	CAVRLVKAGA	SIIGVNCHEFD	PTISLKTIVKL	MKEGLEAARL	KAHLMVQPLA		250
小鼠 <i>M. musculus</i>	CAVRLVKAGA	SIIGVNCHEFD	PSVSLQTVKL	MKEGLEAARL	KAYLMVQPLA		250
黄鲈 <i>P. flavescens</i>	CAVRLVKAGA	QIVGVNCHFD	PMTCVKTVKM	MKEGVKAGL	KAHYMVQPLA		243
鲈鱼 <i>L. japonicus</i>	CAVRLVKAGA	QIVGVNCHFD	PMTCVKTVKM	MKEGVKAGL	KAHYMVQPLA		243
		260	270	280	290	300	
人 <i>H. sapiens</i>	YHTPDCNKQG	FIDLPEFFPG	LEPRVATRWD	IQKYAREAYN	LGVRVYIGGCC		300
小鼠 <i>M. musculus</i>	YHTPDCGKQG	FIDLPEFFPG	LEPRVATRWD	IQKYAREAYN	LGVRVYIGGCC		300
黄鲈 <i>P. flavescens</i>	YHTPDCNCQG	FIDLPEFFPA	LEPRILTRWD	MHTYARVAYK	AGIRFVIGGCC		293
鲈鱼 <i>L. japonicus</i>	FHTPDCNCQG	FIDLPEFFPA	LEPRILTRWD	MHTYAREAYK	VGIRVYIGGCC		293
		310	320	330	340	350	
人 <i>H. sapiens</i>	GFEFPHYRAI	AEELAPERGF	LPPASEKHGS	WGSGLDMHTK	PWVRARARKE		350
小鼠 <i>M. musculus</i>	GFEFPHYRAI	AEELAPERGF	LPPASEKHGS	WGSGLDMHTK	PWIRARARKE		350
黄鲈 <i>P. flavescens</i>	GFEFPHYRAI	AEELSIERGI	MPPASEKHGM	WGAGLEMHTK	PWVRARARRD		343
鲈鱼 <i>L. japonicus</i>	GFEFPHYRAL	TEELAPERGI	MPPGSEKHGM	WGAGLEMHTK	PWVRARARRD		343
		360	370	380	390	400	
人 <i>H. sapiens</i>	YWENLRISAG	RPYNPSMSKP	DGWGVTKGTA	ELMQQKEATT	EQQLKELFEK		400
小鼠 <i>M. musculus</i>	YWQNLRIASG	RPYNPSMSRP	DAWGVTKGAA	ELMQQKEATT	EQQLRELF EK		400
黄鲈 <i>P. flavescens</i>	YWEHLSPASG	RPTCPSMSTP	EGWGVTKGHA	DLLQHKEATS	TQEMKHVLEM		393
		400					
人 <i>H. sapiens</i>	QK-FKSQ-	406					
小鼠 <i>M. musculus</i>	QK-FKSAQ	407					
黄鲈 <i>P. flavescens</i>	QKKAKSSA	401					
鲈鱼 <i>L. japonicus</i>	QKKAKSSA	401					

图 2 人、小鼠、黄鲈和鲈鱼 BHMT 氨基酸序列比较

Fig. 2 The Comparison of BHMT amino acid sequences from *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Perca flavescens* and *Lateolabrax japonicus*

2.3 鲈鱼 BHMT 基因的组织表达及盐度对其表达的影响

用 RT-PCR 分析 BHMT 基因在鲈鱼肌肉、心、眼、脑、鳃、肝、肠、肾、脂、脾 10 个组织中的表达, 结果只在肝、肠和肾有 610 bp 的目的条带出现, 且在肝和肾的表达量明显高于肠(图 4A)。经过 29 h 的 29

度高盐度作用和经过 29 h 的 12 度低盐度作用, 鲈鱼 BHMT 基因仍然只在肝、肠和肾三个组织有表达(图 4B 和 4C)。用 Gel-Pro Analyzer 4 凝胶定量分析软件分析上述 RT-PCR 电泳图, 结果表明, 高盐度组鲈鱼 BHMT 基因 mRNA 在肝、肠和肾三个组织的表达低于对照组(盐度 2.5 度), 而低盐

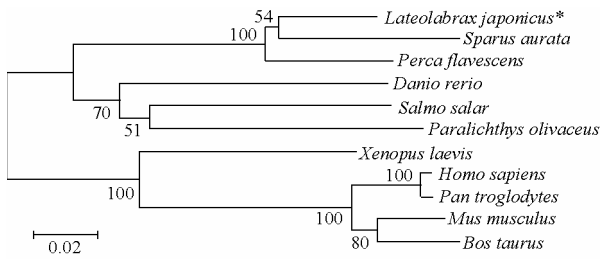


图3 鲈鱼与其他物种 BHMT 氨基酸序列进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of BHMT amino acid sequence of *Lateolabrax japonicus* and those of other species

度组在肝、肠和肾三个组织的表达高于对照组(图 5A)。用定量 PCR 进一步检测盐度对鲈鱼 BHMT 基因在肝、肠和肾的表达的影响发现, 和 RT-PCR 检测结果一样, 高盐度组鲈鱼肝、肠和肾三个组织 BHMT 基因的 mRNA 表达量显著下降, 分别是对照组的 49% ($P < 0.05$)、81% ($P < 0.05$) 和 28% ($P < 0.05$)。低盐度组鲈鱼 BHMT 基因 mRNA 在肝、肠和肾中的表达量高于对照组, 分别是对照组的 1.38 倍 ($P < 0.05$)、1.63 倍 ($P < 0.05$)、1.91 倍 ($P < 0.05$), 见图 5B。

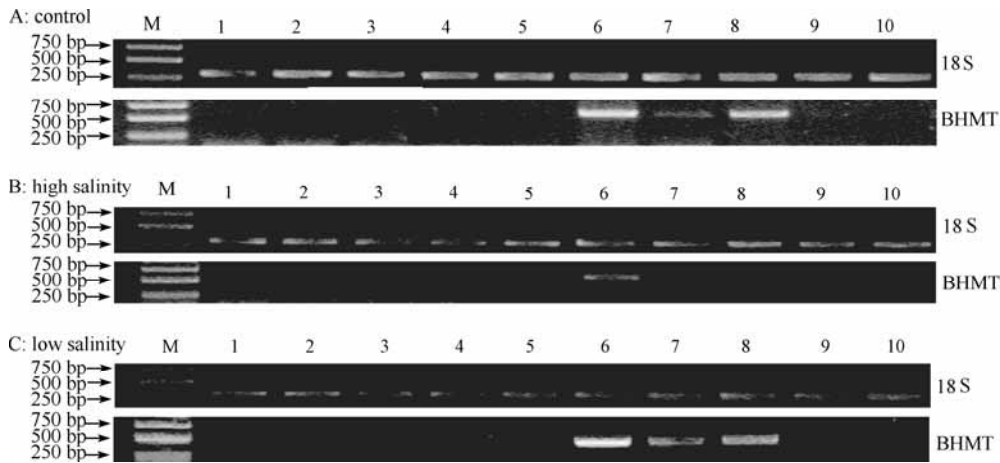


图4 鲈鱼各组织 BHMT 在盐度刺激后的 RT-PCR 电泳图谱
Fig. 4 The RT-PCR electrophoresis pattern of *Lateolabrax japonicus* BHMT after salinity challenge
A: 对照组; B: 高盐组; C: 低盐组; M: DNA 相对分子质量标准; 1: 肌肉; 2: 心; 3: 眼; 4: 脑; 5: 鳃; 6: 肝; 7: 肠; 8: 肾; 9: 脂肪组织; 10: 脾。
A: control; B: high salinity; C: low salinity; M: DNA marker; 1: muscle; 2: heart; 3: eye; 4: brain; 5: gill; 6: liver; 7: intestine; 8: kidney; 9: fat tissue; 10: spleen.

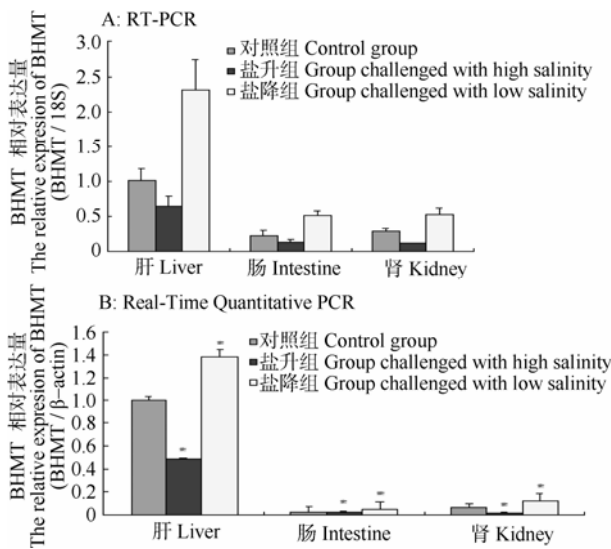


图5 盐度对鲈鱼肝、肠和肾 BHMT 表达的影响
Fig. 5 Effect of salinity on the expression of *Lateolabrax japonicus* BHMT in liver, intestine and kidney
A: RT-PCR; B: Real-time quantitative PCR

2.4 甜菜碱对鲈鱼肝、肠和肾 BHMT 基因表达的影响

用定量 PCR 检测甜菜碱对鲈鱼肝、肠和肾组织

BHMT 基因的表达, 结果表明, 鲈鱼在经过 5 h 的甜菜碱作用后, BHMT 基因在肝、肠和肾组织中的表达量均有增加, 分别是对照组的 2.13 倍 ($P < 0.05$)、4.18 倍 ($P < 0.05$) 和 9.59 倍 ($P < 0.05$), 见图 6。

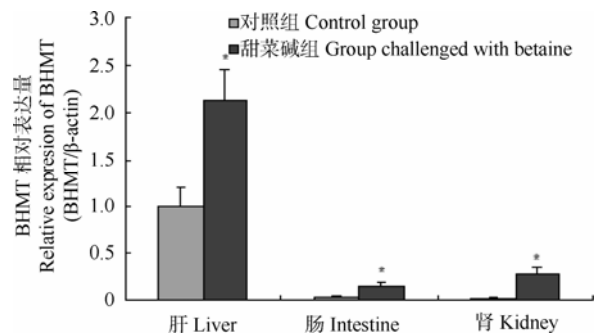


图6 定量 PCR 检测甜菜碱对鲈鱼肝、肠和肾 BHMT 表达的影响
Fig. 6 Effect of betaine on the expression of *Lateolabrax japonicus* BHMT in liver, intestine and kidney by Real-time quantitative PCR analysis

3 讨论

BHMT 是一个由 6 个相同的亚基组成的甲基转

移酶, 位于胞浆中, 催化胆碱氧化途径中甜菜碱的甲基转移反应, 使高半胱氨酸甲基化生成蛋氨酸。和另一个催化N5-甲基四氢叶酸的甲基转移使高半胱氨酸甲基化生成蛋氨酸的MS一样, BHMT也具有 Zn^{2+} 依赖的硫醇和硒醇甲基转移酶家族的结构特征(Breksa & Garrow, 1999), 即具有G(ILV)NCX结构的基序A和具有(ALV)X(2)(LV)GGCCX(3) PX(2)I结构的基序B(Millian & Garrow, 1998; González et al, 2004)。人BHMT的基序A和B分别是GVNCH²¹⁸和VRYIGGCCGFEPYHI³⁰⁷(Breksa & Garrow, 2002)。研究表明, 人BHMT这两个结构基序中的三个半胱氨酸(217、299 和 300)与 Zn^{2+} 结合后才激活高半胱氨酸, 但如果将其中的任何一个半胱氨酸进行突变, BHMT都将无法与 Zn^{2+} 结合而失去催化功能(Pajares & Perez-Sala, 2006)。对鲈鱼BHMT基因cDNA序列分析表明, 鲈鱼BHMT由 401 个氨基酸组成, 其基序A与人BHMT基序A一样, 为GVNCH²¹¹, 基序B为IRYIGGCCGFEPYHI³⁰⁰, 三个半胱氨酸分别位于 210、292 和 293, 与人BHMT的同源性也达到 79%, 推测我们克隆的鲈鱼BHMT是具有催化功能的酶。

BHMT 在哺乳动物各组织中有广泛的表达(Waditee & Incharoensakdi, 2001; Mckeever et al, 1991), 主要集中在肝和肾, 在肝中的表达, 甚至占全部蛋白质的 0.6%~1.6%(Yamashita et al, 2000; Mckeever et al, 1991)。但BHMT的表达特征也因生物物种而异, 如人、猪和大鼠在肾中的表达量就较低(Yamashita et al, 2000), 而羊的胰腺、猕猴的晶状体中BHMT均有很高的表达量(Mckeever et al, 1991)。鲈鱼BHMT的表达模式与哺乳动物基本一致, 我们用RT-PCR检测鲈鱼的肌、心、眼、脑、鳃、肝、肠、肾、脂、脾10个组织, BHMT只在肝、肠和肾有较高的表达。

Craig(2004)研究表明, 机体对BHMT的调控主要发生在转录水平, 食物是引起其表达变化的最主要因素之一。当喂以蛋氨酸缺乏的食物时, 大鼠肝脏的BHMT mRNA含量和酶活性均有提高(Park & Garrow, 1999)。蛋氨酸含量受到限制时, 食物中增加甜菜碱和胆碱等甲基供体能更大程度地诱导

BHMT的表达(Martin & Finkelstein, 1981), 并且这些甲基供体的吸收量和BHMT的表达量之间存在剂量相关性(Junnila, 2000), 同样在鸡饲料中加入甜菜碱后, BHMT的活性可增加(Craig, 2004)。BHMT是催化分解甜菜碱的, 因而当体内甜菜碱含量升高后刺激BHMT基因的表达量增加(Balinska & Paszewski, 1979)。由于BHMT的启动子上有许多激素的调控元件, 所以激素的刺激也能引起BHMT表达的变化, 氢化可的松、皮质醇和曲安西龙都能增加BHMT的活性和mRNA水平, 而生长激素只能诱导BHMT mRNA转录(Pajares & Perez-Sala, 2006)。在不受激素影响的HepG2细胞系中用荧光素酶报告基因系统研究发现, 甜菜碱和含硫氨基酸的浓度能改变BHMT启动子活性, 但是它们是如何启动BHMT基因转录的分子机制尚不清楚(Lu et al, 2010)。在本实验中, 鲈鱼腹腔注射甜菜碱后, 肝、肠和肾BHMT基因的表达量都有所上升, 表明鱼类跟其他脊椎动物一样, 甜菜碱能改变BHMT的表达。

另一个引起BHMT表达变化的因素是环境渗透压。猪在吸收高NaCl后, 其肝脏、肾脏BHMT表达降低(Sunden et al, 1997), 体外实验也证实, BHMT在渗透压调节中起重要作用(García-Pérez & Burg, 1991), H4IIE细胞在高渗时, BHMT表达减少, 而在低渗时增加, 酪氨酸激酶或环嘌呤核苷酸依赖的激酶会损害BHMT对渗透压的敏感性(Junnila, 2002)。在鱼类中也发现环境渗透压能改变BHMT的表达, 如香鱼(*Plecoglossus altivelis*)从淡水转到海水时, 鳃中BHMT蛋白和mRNA表达均有下调(Lu et al, 2010), 本实验结果表明, 将鲈鱼从盐度为25的海水转入盐度为29的海水后, 肝、肠和肾BHMT基因表达量显著下降; 而转入低盐(12度)后, 肝、肠和肾的表达量都有显著上升, 从而提高甜菜碱的分解代谢, 降低细胞内甜菜碱的浓度利于适应低渗环境, 显示BHMT基因在调节鲈鱼渗透压的过程中发挥着重要的作用, 但是鱼类BHMT的调节机制是否与哺乳动物一样有相同的激酶途径参与还有待于进一步研究。

参考文献：

- homocysteine S-methyltransferase: identification of three cysteine residues critical for zinc binding [J]. *Biochemistry*, **38**: 13991-13998.
- Brekka AP, Garrow TA. 2002. Random mutagenesis of the zinc-binding motif of betaine-homocysteine methyltransferase reveals that Gly 214 is essential [J]. *Arch Biochem Biophys*, **399**: 73-80.
- Craig SA. 2004. Betaine in human nutrition[J]. *Am J Clin Nutr*, **80**:539-546.
- Fisher MC, Zeisel SH, Mar MH, Sadler TW. 2002. Perturbations in choline metabolism cause neural tube defects in mouse embryos *in vitro* [J]. *FASEB J*, **16**: 619-621.
- García-Pérez A, Burg MB. 1991. Renal medullary organic osmolytes [J]. *Physiol Rev*, **71**: 1081-1115.
- González B, Pajares MA, Martínez-Ripoll M, Blundell TL, Sanz-Aparicio J. 2004. Crystal structure of rat liver betaine homocysteine s-methyltransferase reveals new oligomerization features and conformational changes upon substrate binding [J]. *Mol Biol*, **338**: 771-782.
- Junnila M. 2000. Betaine as a lipotropic agent and as an alleviator of osmotic stress[D]. Ph.D. thesis, University of Helsinki.
- Lu XJ, Chen J, Huang ZA, Shi YH, Wang F. 2010. Proteomic analysis on the alteration of protein expression in gills of ayu (*Plecoglossus altivelis*) associated with salinity change [J]. *Comp Biochem Physiol Part D*, **5**: 185-189.
- Martin JJ, Finkelstein JD. 1981. Enzymatic determination of betaine in rat tissues[J]. *Anal Biochem*, **111**: 72-76.
- McKeever MP, Weir DG, Molloy A, Scott JM. 1991. Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat[J]. *Clin Sci*, **81**: 551-556.
- Millian NS, Garrow TA. 1998. Human betaine-homocysteine methyltransferase is a zinc metalloenzyme[J]. *Arch Biochem Biophys*, **356**: 93-98.
- Neece DJ, Griffiths MA, Garrow TA. 2000. Isolation and characterization of a mouse betaine-homocysteine S-methyltransferase gene and pseudogene[J]. *Gene*, **250**: 31-40.
- Park EI, Garrow TA. 1999. Interaction between dietary methionine and methyl donor intake on rat liver betaine homocysteine methyltransferase gene expression and organization of the human gene[J]. *Biol Chem*, **274**: 7816-7824.
- Pajares MA, Perez-Sala D. 2006. Betaine homocysteine S-methyltransferase: just a regulator of homocysteine metabolism?[J]. *Cell Mol life Sci*, **63**: 2792-2803.
- Polat A, Beklevik G. 1998. The Importance of Betaine and Some Attractive Substances as Fish Feed Additives [M]//Brufau J, Tacon A. Feed Manufacturing in the Mediterranean Region: Recent Advances in Research and Technology. Spain: CIHEAM, 217-220.
- Sandra G, Heil, Karin JA, Lievers, Godfried H, Boers, Petra Verhoef, Martin den Heijer Frans JM, Trijbels, Henk JB.2000. Betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT): Genomic sequencing and relevance to hyperhomocysteinemia and vascular disease in humans [J]. *Mol Genet Metab*, **71**: 511-519.
- Schäfer C, Hoffmann L, Heldt K, Lornejad-Schäfer MR, Brauers G, Gehrmann T, Garrow TA, Häussinger D, Mayatepek E, Schwahn BC, Schliess F. 2007. Osmotic regulation of betaine homocysteine S-methyltransferase expression in H4IIE rat hepatoma cells [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **292**: 1089-1098.
- Sunden SL, Renduchintala MS, Park EI, Miklasz SD, Garrow TA. 1997. Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene[J]. *Arch Biochem Biophys*, **345**: 171-174.
- Waditee R, Incharoensakdi A. 2001. Purification and kinetic properties of betaine-homocysteine methyltransferase from *Aphanethece halophytica* [J]. *Curr Microbiol*, **43**: 107-111.
- Wettstein M, Weik C, Holneicher C, Hussinger D. 1998. Betaine as an osmolyte in rat liver: metabolism and cell-to-cell interactions[J]. *J Hepatology*, **27**: 787-793.
- Yamashita T, Hashimoto S, Kaneko S, Nagai S, Toyoda N, Suzuki T, Kobayashi K, Matsushima K. 2000. Comprehensive gene expression profile of a normal human liver [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **269**: 110-116.