

Zhang Y J, Cui Y R, Yan L Y, *et al.* Genomic analysis of the *Acs1* gene family in the *Gymnocypris przewalskii* and its response to saline-alkali stress [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2025, 49(10): 102510. [张玉璟, 崔妍蓉, 颜鲁杨, 等. 青海湖裸鲤ACSL基因家族的全基因组分析及其盐碱胁迫响应 [J]. 水生生物学报, 2025, 49(10): 102510.]

青海湖裸鲤ACSL基因家族的全基因组分析及其盐碱胁迫响应

张玉璟^{1,2} 崔妍蓉^{1,2} 颜鲁杨² 张罗丹^{1,2} 王统刚^{1,2} 魏姝瑾²
卫福磊¹ 俞录贤³ 梁 健²

(1. 青海大学生态环境工程学院, 西宁 810016; 2. 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 西宁 810016; 3. 青海湖裸鲤救护中心, 西宁 810016)

摘要: 为探究长链酰基辅酶A合成酶(ACSL)基因家族在青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)盐碱适应中的作用, 研究基于裸鲤全基因组数据对ACSL家族进行了系统鉴定, 并分析了盐碱胁迫(盐度16.67‰, 碱度32 mmol/L)条件下ACSL家族的组织特异表达模式。结果显示, 青海湖裸鲤ACSL基因家族包含9个成员(*ACSL1a*、*ACSL1b*、*ACSL2*、*ACSL3a*、*ACSL3b*、*ACSL4a*、*ACSL4b*、*ACSL5*、*ACSL6*), 分别编码640—834个氨基酸。Motif和结构域分析表明, 除*ACSL3a* (缺失motif6、motif10)和*ACSL3b* (缺失motif10)外, 其余成员均拥有10个motif。9个ACSL基因分布于9条染色体(Chr8、13、15、40、41、48、64、82、87)。所有ACSL蛋白均为亲水性蛋白, 其中*ACSL4b*产物为酸性蛋白质, 其余均为碱性蛋白质。除*ACSL2*和*ACSL3a*外, 其余均为稳定蛋白。亚细胞定位预测结果显示, *ACSL2*定位于细胞质, *ACSL3a*、*ACSL3b*、*ACSL4a*、*ACSL4b*定位于过氧化物酶体, 其余均定位于细胞膜。qRT-PCR结果显示, ACSL基因家族成员表现出不同的组织分布模式, *ACSL3b*、*ACSL4b*和*ACSL5*在肾脏中高表达, *ACSL3a*、*ACSL4a*和*ACSL5*在肠道中高表达。在盐碱胁迫后, *ACSL2*、*ACSL3a*、*ACSL6*在鳃组织中显著上调, *ACSL1a*、*ACSL2*、*ACSL3a*、*ACSL5*在肾脏组织中显著上调, *ACSL3b*、*ACSL6*在肠道组织中表达显著上调。研究揭示了青海湖裸鲤ACSL基因家族在盐碱胁迫下通过脂代谢供能、维持渗透平衡及免疫调控的多种生理功能。

关键词: 长链酰基辅酶A合成酶; 盐碱胁迫; 基因家族; 青海湖裸鲤

中图分类号: Q344⁺.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2025)10-102510-10

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0019 CSTR: 32229.14.SSSWXB.2025.0019



长链酰基辅酶A合成酶(Long-chain acyl -CoA synthetase, ACSL)是调控脂质代谢初始步骤的关键酶, 主要功能是催化含有12—20个碳原子的脂肪酸(Fatty Acid, FA)形成脂酰辅酶A^[1-3]。脂酰辅酶A作为重要的代谢中间产物, 既可通过 β -氧化途径产生能量, 又可作为前体物质参与甘油三酯、磷脂和胆固醇等复杂脂质的生物合成^[4]。脂质在生物体内具有多重生理功能, 磷脂是细胞膜的主要结构成分, 甘油三酯是主要的能量储备, 某些脂质衍生物则在细胞信号传导等过程中发挥重要作用。研究发现, ACSL基因家族在进化过程中呈现出物种特异性分

化, 在哺乳动物中存在5个ACSL成员, 包括*ACSL1*、*ACSL5*、*ACSL6*、*ACSL3*及*ACSL4*^[5, 6]; 硬骨鱼类中还发现了新成员*ACSL2*, 为研究ACSL基因家族的系统进化提供了新视角^[7]。

近年来, 诸多研究表明水生动物通过调控脂质代谢途径来响应非生物胁迫, 特别是盐碱胁迫^[8, 9]。盐碱胁迫会显著影响甘油磷脂代谢过程^[10]。如Wei等^[11]发现鲫(*Carassius auratus*)通过增强甘油磷脂代谢和酮体代谢途径来减轻盐碱胁迫造成的机体损伤; Shang等^[12]发现碱胁迫激活了鲤(*Cyprinus carpio*)肝脏组织中的甘油磷脂代谢途径, 进而调节自

收稿日期: 2025-01-14; 修订日期: 2025-04-14

基金项目: 国家自然科学基金(31960741)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31960741)]

作者简介: 张玉璟(1997—), 女, 硕士研究生; 研究方向为动物生态学。E-mail: 2294954429@qq.com

通信作者: 梁健(1983—), 男, 博士, 教授; 主要从事高原特色生物资源的生物化学与分子生物学研究。E-mail: liangjianws@126.com

噬过程。另外,盐碱胁迫也会诱导鱼类脂肪酸组成发生变化参与维持渗透平衡。如Cheng等^[13]发现经过盐碱水养殖的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*),肌肉组织中多不饱和脂肪酸含量显著增加,这可能是其应对高渗环境的重要适应机制。笔者所在团队前期研究发现,青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)在盐碱耐受过程中,其鳃组织中花生四烯酸代谢和类固醇生物合成途径显著富集^[14]。上述研究表明,ACSL基因家族在鱼类盐碱适应过程中发挥重要作用。

青海湖裸鲤是青海湖(盐度约16.67‰,碱度约32 mmol/L, pH 9.2—9.4)的核心物种,对盐碱环境表现出较强的适应能力^[15,16]。本研究拟通过系统分析青海湖裸鲤ACSL基因家族成员的功能域、基序、基因结构和进化特征,并结合盐碱胁迫下不同组织的表达模式,深入探讨ACSL基因家族在青海湖裸鲤适应盐碱胁迫过程中的分子调控机制,为揭示鱼类盐碱适应机制提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼与急性盐碱胁迫实验

实验用鱼由青海湖裸鲤救护中心提供。实验用盐为青岛海科通用海水素有限公司生产的海量星海水素,碳酸氢钠和无水碳酸钠分别购自上海广诺化学科技有限公司和国药集团化学试剂有限公司。

实验开始前,取30条实验鱼[一龄鱼,体长(11.77±0.25) cm,体重(17.84±0.66) g]在盐度(3.07±0.43)‰,水体pH 6.16±0.06,水体溶氧量6.94±0.21,水体氨氮3.71±0.08的自来水中驯化14d。期间每天换水,水温维持在(15±1)℃,并保持充足的氧气,每日进行1次定时投喂(饲喂量为鱼体重的5%)。在驯化结束后,实验设置2组(将30条实验鱼随机分配至2个养殖箱,养殖水体积为40 L),CK(盐度3‰)和YJ100%组(盐度为16.67‰,碱度为32 mmol/L),每组设置3个生物学重复,每个重复5尾鱼。对照组依旧按照驯化期间的条件进行养殖。盐碱胁迫处理组养殖时,按64:9:1的比例加入海水晶、NaHCO₃和Na₂CO₃。为了防止应激反应,实验过程中每天递增10%的盐碱度来调整养殖水体的盐碱度,至第10天养殖水体的盐碱度达到YJ100%(盐度为16.67‰,碱度为32 mmol/L),YJ100%处理组的盐碱度与青海湖湖水的盐碱度基本保持一致。CK组和YJ100%组再经过96h的养殖后,每组分别随机选取3条生长状况良好的鱼采集鳃、脑、眼、肌肉、脾脏、肠道、肝脏、心脏、肾脏9个组织,并快速冷冻于液氮中,保存在-80℃冰箱中备用。

1.2 ACSL基因家族成员鉴定和系统进化树分析

ACSL基因家族成员的鉴定采用BLASTP比对方法。以NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)中获取的人(*Homo sapiens*)和斑马鱼(*Danio rerio*) ACSL基因家族蛋白序列为查询序列,使用TBtools软件^[17]对青海湖裸鲤基因组数据进行检索。通过PFAM数据库(<http://pfam-legacy.xfam.org/>)验证候选蛋白的保守结构域。

使用MUSCLE工具进行多序列比对,trimAl修剪不可靠比对区域。采用IQ-TREE构建人(*Homo sapiens*)、家鼠(*Mus musculus*)、鸡(*Gallus gallus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、金鲳(*Trachinotus ovatus*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)的ACSL基因系统进化树(表1),选择最佳进化模型(MFP),进行1000次自举分析,并应用加权非参数靴带算法(bnni)提高树的可信度,使用R脚本和ggtree包对系统发育树进行可视化。

1.3 ACSL基因家族模体分析和染色体定位分析

保守基序分析采用MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>),最大基序数设置为10,使用TBtools和Adobe Illustrator可视化结果。利用青海湖裸鲤基因组注释文件,通过在线软件MG2C (http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/)将ACSL基因定位到染色体。

1.4 ACSL基因家族结构及蛋白理化性质分析

通过GSDS (https://gsds.gao-lab.org/Gsds_help.php)分析ACSL基因的内含子-外显子结构。使用ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>)进行蛋白理化特征分析。使用Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>)预测ACSL基因家族成员的亚细胞定位。

1.5 cDNA的合成和实时定量PCR

通过实时荧光定量PCR分析9种不同组织(鳃、脑、眼、肌肉、脾脏、肠道、肝脏、心脏、肾脏)中的ACSLs基因表达情况。使用TRIzol (Ambion, USA)提取每个组织的总RNA,超微量核酸蛋白测定仪(NanoPhotometer® NP80, IMPLLEN)检测提取总RNA的浓度和纯度。检测合格的样品利用Primer Script™ RT Master Mix (Perfect real time)试剂盒反转录成荧光模板,根据TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒的操作说明进行基因相对表达量检测。通过primer3.0 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)和Oligo7.0设计荧光引物(表2),以EF-1α为内参基因,反应体系为20 μL。反应条件:95℃, 30s; 95℃, 5s; 55℃, 30s; 72℃, 30s; 40个循

表 1 用于构建系统进化树分析的物种

Tab. 1 Species used for constructing phylogenetic trees

基因Gene	物种名称Species	蛋白ID Protein ID	基因Gene	物种名称Species	蛋白ID Protein ID
<i>ACSL1</i>	<i>Homo sapiens</i>	XP_016863376.1	<i>ACSL4a</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_021417381.1
<i>ACSL3</i>	<i>Homo sapiens</i>	NP_001341087.1	<i>ACSL4b</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_036846061.1
<i>ACSL4</i>	<i>Homo sapiens</i>	NP_001305438.1	<i>ACSL5</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_036802493.1
<i>ACSL5</i>	<i>Homo sapiens</i>	NP_057318.2	<i>ACSL6a</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_021479764.1
<i>ACSL6</i>	<i>Homo sapiens</i>	NP_056071.2	<i>ACSL6b</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_021473183.2
<i>ACSL1</i>	<i>Mus musculus</i>	NP_001289092.1	<i>ACSL1</i>	<i>Trachinotus ovatus</i>	—
<i>ACSL3</i>	<i>Mus musculus</i>	NP_001028778.2	<i>ACSL3</i>	<i>Trachinotus ovatus</i>	—
<i>ACSL4</i>	<i>Mus musculus</i>	NP_997508.1	<i>ACSL4</i>	<i>Trachinotus ovatus</i>	—
<i>ACSL5</i>	<i>Mus musculus</i>	NP_082252.1	<i>ACSL5</i>	<i>Trachinotus ovatus</i>	—
<i>ACSL6</i>	<i>Mus musculus</i>	NP_659072.3	<i>ACSL6</i>	<i>Trachinotus ovatus</i>	—
<i>ACSL1</i>	<i>Gallus gallus</i>	NP_001012596.1	<i>ACSL1</i>	<i>Salmo salar</i>	XP_014050982.1
<i>ACSL3</i>	<i>Gallus gallus</i>	XP_015132518.2	<i>ACSL3</i>	<i>Salmo salar</i>	XP_045559891.1
<i>ACSL4</i>	<i>Gallus gallus</i>	XP_420317.3	<i>ACSL4</i>	<i>Salmo salar</i>	XP_013992926.1
<i>ACSL5</i>	<i>Gallus gallus</i>	NP_001026408.2	<i>ACSL5</i>	<i>Salmo salar</i>	XP_014014165.2
<i>ACSL6</i>	<i>Gallus gallus</i>	XP_015149562.2	<i>ACSL1</i>	<i>Oryzias latipes</i>	XP_004073594.1
<i>ACSL1a</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_036789272.1	<i>ACSL3</i>	<i>Oryzias latipes</i>	XP_004075516.1
<i>ACSL1b</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_036825834.1	<i>ACSL4</i>	<i>Oryzias latipes</i>	XP_020562387.1
<i>ACSL2a</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_036791737.1	<i>ACSL3</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_025754202.1
<i>ACSL2b</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_036835646.1	<i>ACSL4</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_025753702.1
<i>ACSL3a</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_036820741.1	<i>ACSL5</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_025765403.1
<i>ACSL3b</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_036822467.1			

注: 表中所有物种的基因用于构建系统发育树(图 2)
Note: The genes of all species in the table are used to construct phylogenetic trees (Fig. 2)

表 2 用于qRT-PCR 分析的引物序列

Tab. 2 Primer sequences for qRT-PCR analysis

基因 Gene	序列 Sequence (5'—3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
<i>EF-α</i> F	GTATTACCATTGACATTGC	55
<i>EF-α</i> R	CTGAGAAGTACCAGTGAT	
<i>ACSL1a</i> F	TCGAGAACATCTACATCCGCAG	55
<i>ACSL1a</i> R	CTTCAGTCCAGCTTCTTTCCCT	
<i>ACSL1b</i> F	CCTCTCCACAAACACCCTCC	60
<i>ACSL1b</i> R	CTCGTACATGGTCTTGGCGT	
<i>ACSL2</i> F	TATCCGGGGTCACAGTGTCT	60
<i>ACSL2</i> R	GGAGAACAGGAACACAGCGA	
<i>ACSL3a</i> F	CCTGCCATACCTGTTGCTGA	57
<i>ACSL3a</i> R	AGTCGAAGTGAGGAAAGCGG	
<i>ACSL3b</i> F	CATCACTTTCCTGCCCTGGT	60
<i>ACSL3b</i> R	GCATCTCATCCTCCTCGCTC	
<i>ACSL4a</i> F	GGAGCTACACACCTGGTCAC	57
<i>ACSL4a</i> R	GGAGCCGCTGGTGACATAA	
<i>ACSL4b</i> F	CCAGCAGCCACGTAATACCA	60
<i>ACSL4b</i> R	CATGGCAAGAGACTGTGGGT	
<i>ACSL5</i> F	GAGCGTCTTTGTACCCGTT	55
<i>ACSL5</i> R	TCAGGGCTTTCATGTCTGCT	
<i>ACSL6</i> F	CAAGAGGAAAGGGCTGGAGG	60
<i>ACSL6</i> R	GGGTGGTGATGTGCATCC	

环。每个样品设3次重复。

1.6 数据分析

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算*ACSLs*在对照和盐碱胁迫条件下不同组织中的相对表达量^[18], 使用Excel 2021

进行数据处理。使用SPSS 26.0软件分别分析*ACSLs*基因在CK组和YJ100%组不同组织的表达差异水平, 以 $P<0.05$ 为差异极显著, $P<0.01$ 为差异显著作为检验标准, 并使用GraphPad 10.4进行可视化。

2 结果

2.1 *ACSL*基因家族成员的鉴定和系统进化树分析

青海湖裸鲤全基因组范围内共鉴定出9个*ACSL*基因家族成员, 将这9个成员命名为*ACSL1a*、*ACSL1b*、*ACSL2*、*ACSL3a*、*ACSL3b*、*ACSL4a*、*ACSL4b*、*ACSL5*和*ACSL6*。利用最大似然法对哺乳动物、鸟和适应于不同盐碱度的硬骨鱼类的*ACSL*家族成员构建了系统进化树(图 1)。聚类结果显示, 系统进化树分为独立的三支, 其中, *ACSL1*、*ACSL5*和*ACSL6*聚为一支, 并且*ACSL1*和*ACSL6*在硬骨鱼类中表现出特异性的复制; *ACSL2*单独形成一支; *ACSL3*和*ACSL4*聚为一支, 并且*ACSL3*和*ACSL4*在硬骨鱼类中表现出特异性的复制。实验还发现, 在所选取的物种中, 青海湖裸鲤*ACSL3b*蛋白与虹鳟*ACSL3b*蛋白亲缘关系最近; 青海湖裸鲤*ACSL4a*蛋白与大西洋鲑*ACSL4*蛋白及虹鳟*ACSL4b*蛋白亲

缘关系最近;青海湖裸鲤*ACSL5*蛋白与大西洋鲑*ACSL5*蛋白及虹鳟*ACSL5*蛋白亲缘关系最近。

2.2 *ACSL*基因家族成员模体分析

Motif分析(最大基序数设为10)显示, *ACSL*家族成员除了*ACSL3a*缺少motif6和motif10, *ACSL3b*缺少motif10以外, 其余成员均检索到10个相同的motif(图2A)。Domain分析鉴定出4个保守结构域, 其中*ACSL1a*、*ACSL1b*、*ACSL2*、*ACSL5*、*ACSL6*的保守结构域是LC-FACS_euk; *ACSL3a*、*ACSL3b*、*ACSL4a*、*ACSL4b*的保守结构域是AFD_class_I

superfamily、LC-FACS_euk1和 entF superfamily(图2B)。

2.3 *ACSL*基因家族成员基因结构和染色体定位分析

基因结构分析结果显示, 青海湖裸鲤*ACSL1a*和*ACSL1b* 5'端有1个UTR, 3'端有2个UTR, 其余成员均无UTR; *ACSL1a*、*ACSL1b*、*ACSL2*、*ACSL5*和*ACSL6*的外显子数目最多, 有20个, *ACSL3a*的外显子数目最少, 有12个(图3), 各基因的结构差异较大。通过染色体定位分析表明, *ACSL1a*、*ACSL1b*、

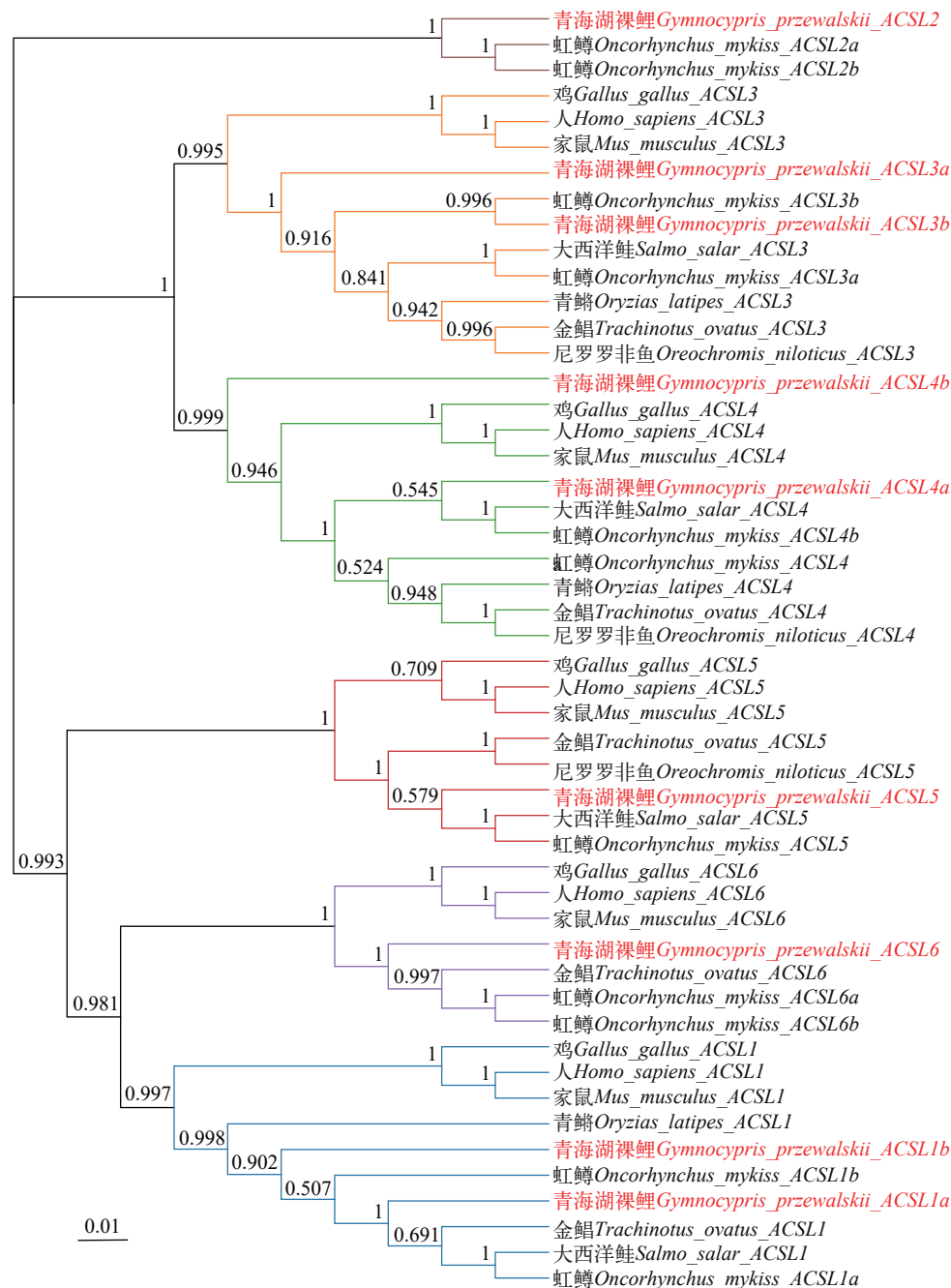


图1 各物种*ACSL*基因家族成员系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *ACSL* gene family members in the selected species

ACSL2、*ACSL3a*、*ACSL3b*、*ACSL14a*、*ACSL4b*、*ACSL5*和*ACSL6*分别位于Chr64、Chr13、Chr82、Chr87、Chr48、Chr15、Chr8、Chr40和Chr41 9条染色体上(图4)。

2.4 *ACSL*基因家族成员理化性质分析

各成员编码区(CDS)长度1923—2505 bp。其中,*ACSL6*最长,为2505 bp,编码834个氨基酸;

*ACSL3a*最短,为1923 bp,编码640个氨基酸。分子量为71.77—93.12 kD。蛋白理论等电点介于5.96—9.23。脂溶性指数为83.24—96.84。亲水性平均值为0.219—0.046。不稳定性指数为33.05—47.83;亚细胞定位预测显示,*ACSL1a*、*ACSL1b*、*ACSL5*、*ACSL6*定位于细胞膜,*ACSL2*定位于细胞质,*ACSL3a*、*ACSL3b*、*ACSL4a*、*ACSL4b*定位于过氧化物酶体

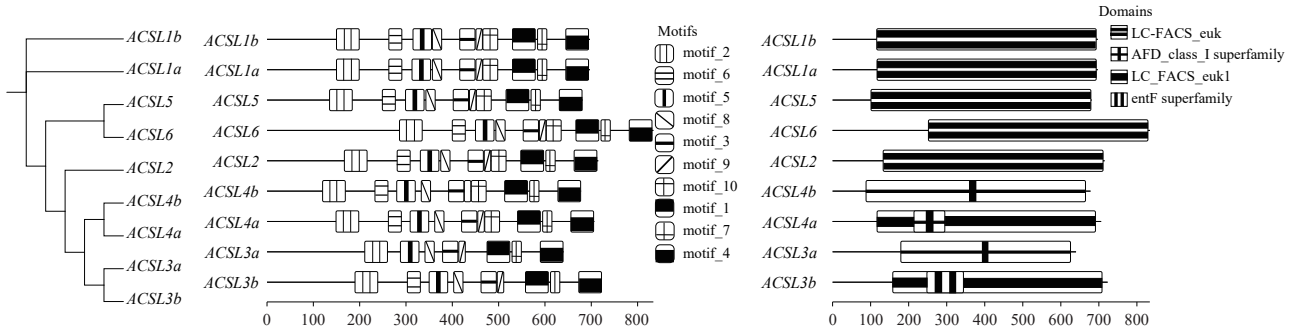


图2 青海湖裸鲤*ACSL*基因家族的基序(A)和结构域(B)

Fig. 2 Motif (A) and domain (B) of the *ACSL* gene family in *Gymnocypris przewalskii*

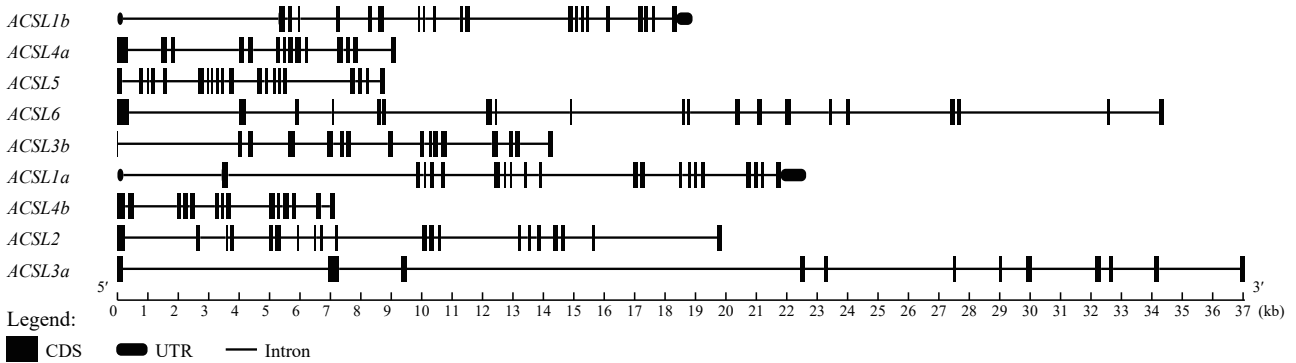


图3 青海湖裸鲤*ACSL*家族基因结构

Fig. 3 Gene structure of *ACSL* family in *Gymnocypris przewalskii*

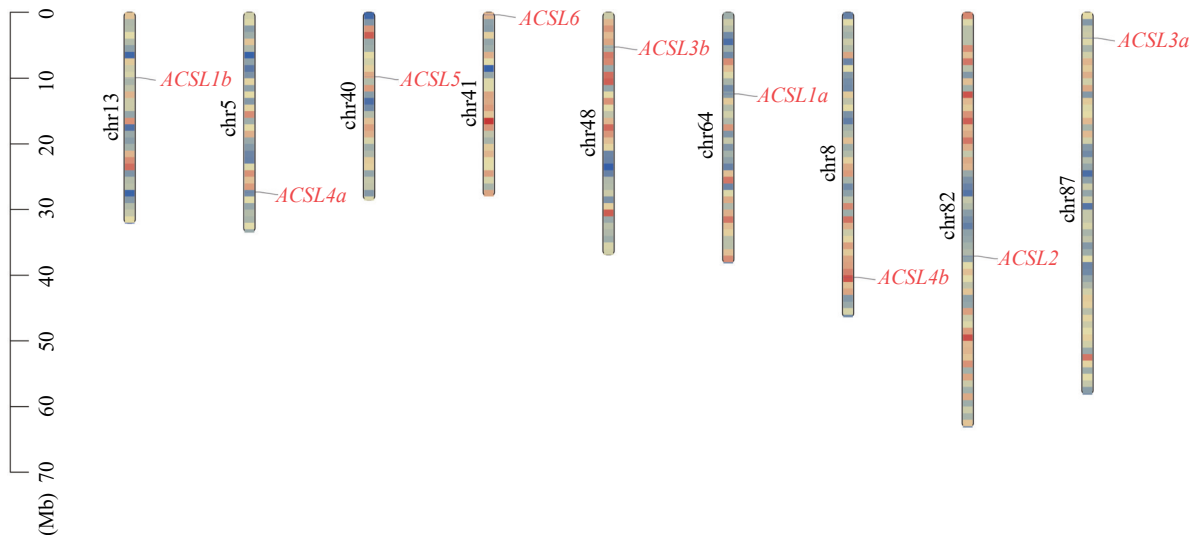


图4 青海湖裸鲤*ACSL*基因在染色体上的分布

Fig. 4 Distribution of *ACSL* gene on chromosomes in *Gymnocypris przewalskii*

(表 3)。

2.5 *ACSL* 基因家族成员在淡水和盐碱胁迫下不同组织表达谱分析

利用 qRT-PCR 检测了 9 个 *ACSLs* 家族基因在淡水养殖的裸鲤不同组织中的表达。结果显示, 在 9 种不同组织中均检测到 *ACSL* 基因的表达, 但其表达模式存在差异。 *ACSL3b*、*ACSL4b* 和 *ACSL5* 在肾脏中高表达, *ACSL3a*、*ACSL4a* 和 *ACSL5* 在肠道中高表达; 除 *ACSL3b*、*ACSL4a*、*ACSL4b*、*ACSL6* 外, 其他成员均在肌肉中高表达(图 5A)。盐碱胁迫后发现, *ACSL1a* 在肾脏中显著上调, *ACSL2* 和 *ACSL3a* 在鳃和肾脏中极显著上调; *ACSL4a*、*ACSL4b* 和 *ACSL5* 在肌肉中显著上调; *ACSL6* 在鳃组织中表达显著上调(图 5B)。

3 讨论

目前 *ACSL* 基因家族已在人类、小鼠、鸡、鱼类等物种中进行了鉴定和功能研究。在人、鼠和鸡中, 共鉴定 5 个 *ACSL* 基因, 分别命名为 *ACSL1*、*ACSL3*—6。然而, 在斑马鱼、虹鳟等硬骨鱼类中鉴定出了 *ACSL2*, 并且硬骨鱼的 *ACSL1*、*ACSL3* 发生了基因的特异性复制事件, 斑马鱼和洞穴鱼的 *ACSL4* 发生了基因的特异性复制事件^[7]。本研究在青海湖裸鲤基因组中共鉴定出 9 个 *ACSL* 基因家族成员, *ACSL1*、*ACSL3*、*ACSL4* 具备上述特异复制特征, 同时也鉴定出了 *ACSL2*, 表明本研究鉴定的青海湖裸鲤 *ACSL* 基因家族是完整的, 为后续分析奠定了基础。

3.1 *ACSL* 基因家族的盐碱适应性进化分析

两轮全基因组复制事件造就了现存脊椎动物谱系中 *ACSL* 基因的多样性。在脊椎动物的祖先中, 两个独立的基因分别演化出了如今的 *ACSL1/5/6* 基因家族和 *ACSL3/4* 基因家族, 而硬骨鱼类还发生

了特有的第三轮全基因组复制^[19, 20]。目前报道的脊椎动物 *ACSL* 家族通常存在 5 个 *ACSL* 基因: *ACSL1*、*ACSL3*—6, 而硬骨鱼类拥有更多的 *ACSL* 基因拷贝数。本研究在青海湖裸鲤基因组中鉴定出 *ACSL1*、*ACSL3*、*ACSL4* 发生了复制, 分别产生了两个亚型, 这与斑马鱼和刺鱼的结果是一致的^[7]。

全基因组复制会产生完全相同的染色体组, 后续的染色体重排会逐渐将基因分散到不同染色体, 但部分祖先基因组的共线性区域可能被保留下来, 导致同源基因分布于不同染色体的对应位置^[21]。如本研究中染色体定位结果显示, *ACSL1a/1b*、*ACSL3a/3b*、*ACSL4a/4b* 均处于不同染色体上几乎对应的位置(图 5)。对 *ACSL* 家族的 Motif 分析显示, 除 *ACSL3a* 和 *ACSL3b* 缺失部分基序外, 其他成员均保留 10 个相同基序, 这表明 *ACSL* 家族成员在基序组成上具有保守性, 推测它们的功能相似或相近。*ACSL* 家族成员的理化性质分析显示, 大多数成员理论等电点均大于 7, 推测其可能在碱性亚细胞环境中发挥作用, 有利于青海湖裸鲤适应盐碱水域环境。亚细胞定位发现, *ACSL3a*、*ACSL3b*、*ACSL4a* 和 *ACSL4b* 均定位于过氧化物酶体, 过氧化物酶体作为盐碱环境中的氧化代谢枢纽, 其具备的分解 ROS、脂肪酸 β -氧化功能与盐碱胁迫响应直接相关^[22], 推测这些基因通过调节盐碱胁迫条件下细胞内的氧化还原平衡和代谢稳态从而使其适应盐碱环境。

在全基因组复制事件发生后, 普遍认为留存下来的旁系同源基因能够获得新的表达模式, 全基因组复制后的进化过程作用于这些旁系同源基因的调控区域, 这些区域随后可能会被沉默, 或者发生亚功能化或新功能化^[23, 24]。对青海湖裸鲤 *ACSL* 家族的组织表达谱分析表明, *ACSL1a* 和 *ACSL1b*、*ACSL4a* 和 *ACSL4b* 在大多数组织中共表达, 但是

表 3 青海湖裸鲤 *ACSL* 基因家族成员理化性质

Tab. 3 Physical and chemical properties of *ACSL* gene family members in *Gymnocypris przewalskii*

基因 Gene	CDS 长度 CDS length (bp)	氨基酸数目 Number of amino acid	分子质量 Molecular weight (kD)	理论等电点 Theoretical isoelectric point	脂溶性指数 Aliphatic index	亲水性平均值 Grand average of hydropathicity	不稳定性指数 Instability index	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>ACSL1a</i>	2094	697	77.81	8.43	91.81	-0.133	34.47	Cell membrane
<i>ACSL1b</i>	2094	697	77.85	8.29	87.30	-0.219	34.30	Cell membrane
<i>ACSL2</i>	2148	715	79.25	7.12	94.21	-0.046	42.64	Cytoplasm
<i>ACSL3a</i>	1923	640	71.77	9.23	90.59	-0.159	47.83	Peroxisome
<i>ACSL3b</i>	2172	723	80.51	8.13	88.30	-0.189	36.40	Peroxisome
<i>ACSL4a</i>	2121	706	78.26	7.90	84.76	-0.188	33.05	Peroxisome
<i>ACSL4b</i>	2037	678	74.74	5.96	83.24	-0.207	34.90	Peroxisome
<i>ACSL5</i>	2046	681	75.50	8.06	96.84	-0.060	29.26	Cell membrane
<i>ACSL6</i>	2505	834	93.12	8.36	92.24	-0.181	38.45	Cell membrane

*ACSL3a*和*ACSL3b*在大部分组织(肝脏、肾脏、脾脏、肠道、肌肉)中具有相反的表达模式,与斑马

鱼中的表达模式不同^[7],暗示青海湖裸鲤*ACSL3*复制后出现亚功能化,并且具有一定的物种特异性,

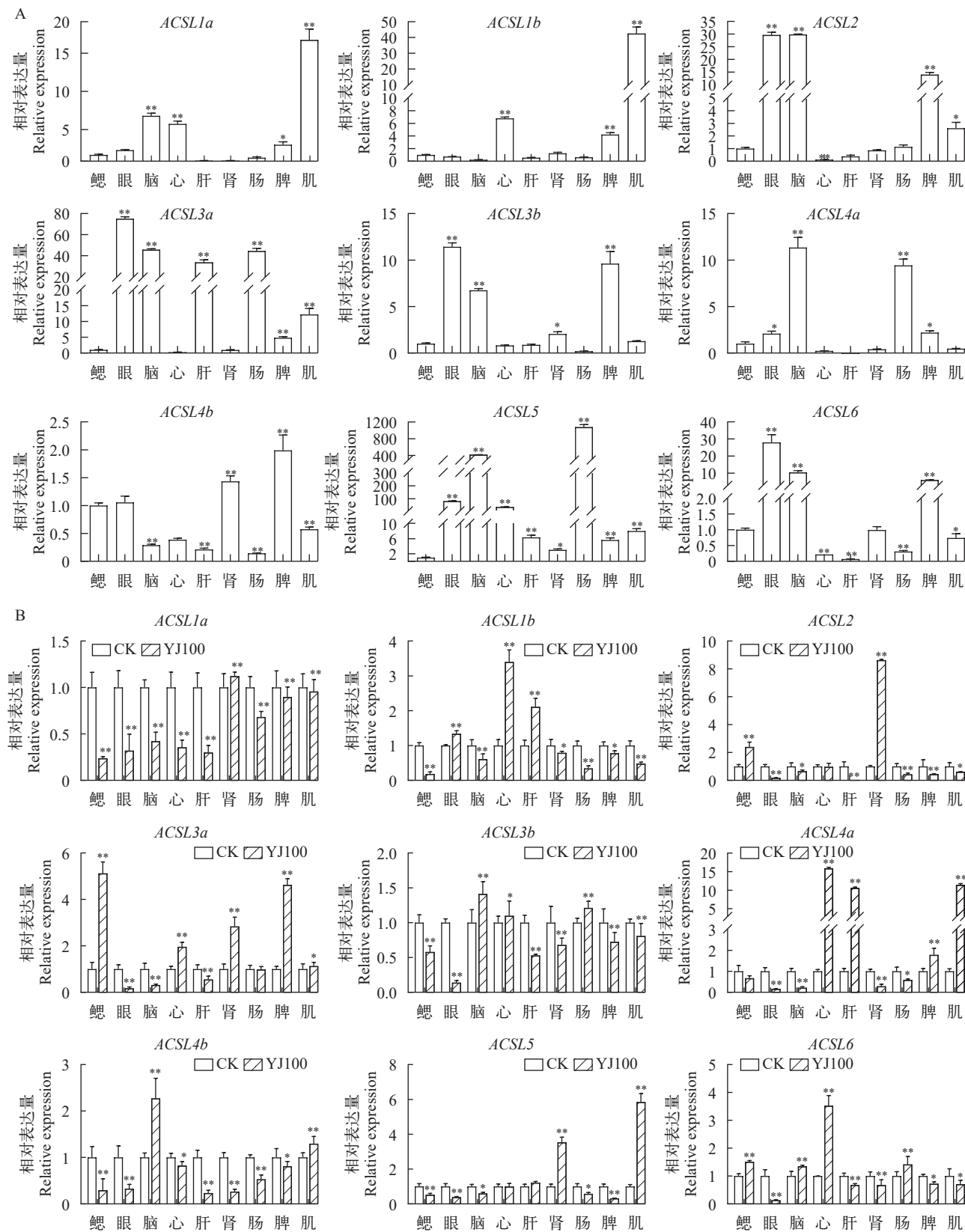


图5 对照(A)及盐碱条件(B)下*ACSL*基因家族成员在不同组织中的表达水平($n=3$)

Fig. 5 Expression analysis of *ACSL* gene family members in various tissues under control (A) and saline-alkali conditions (B) ($n=3$)

* $P<0.05$; ** $P<0.01$

这可能与它生活的环境有关。此外, *ACSL3b*蛋白的系统发育分析结果显示, 青海湖裸鲤与虹鳟亲缘关系最近, 均属于广盐性洄游鱼类, 其不同发育阶段均需适应淡水、半咸水和海水的渗透压变化, 提示它们的*ACSL3*可能在适应类似的环境压力下发挥相同或相似的作用。综上, 推测*ACSL3*可能通过功能分化获得对高盐碱环境的特异响应能力。

3.2 *ACSL*基因家族在盐碱胁迫中的功能分析

为了应对水环境中离子浓度和渗透压的不断变化, 鱼类进化形成了高效的离子和渗透调节机制, 从而维持内环境稳态^[25]。鳃、肾、肠作为硬骨鱼类重要的渗透调节器官, 它们在鱼类适应极端环境的过程中发挥关键作用^[26, 27]。鳃作为鱼类与水环境直接接触的组织, 对水体的物理和化学变化非常敏感, 是鱼类进行渗透调节的主要器官^[28–30]。海水鱼类的鳃组织高表达 Na^+/K^+ -ATP酶(Na^+/K^+ -ATPase, NKA), 能够高效排出体内多余的 Na^+ 和 Cl^- , 减少体内盐分积累, 从而维持渗透平衡^[31]。有研究表明, 胆固醇通过增加脂双层有序性和疏水厚度, 可以形成有利于酶构象变化的局部微环境, 从而显著提高 Na^+/K^+ -ATP酶的催化活性^[32]。*ACSL*通过催化脂肪酸形成脂酰辅酶A, 进而通过 β -氧化途径产生能量。本研究发现, 盐碱胁迫下青海湖裸鲤鳃组织中*ACSL2*、*ACSL3a*和*ACSL6*极显著上调表达, 这些酶的上调可以促进脂肪酸 β -氧化过程, 从而生成更多的乙酰-CoA。乙酰-CoA不仅是脂肪酸代谢的关键中间产物, 也是胆固醇合成的直接前体物质。此外, 本研究还发现, *ACSL1a*、*ACSL2*、*ACSL3a*和*ACSL5*在肾脏中显著上调, *ACSL3b*和*ACSL6*在肠组织中显著上调, 这些基因可能同样间接地调节细胞膜的流动性和稳定性, 协同维持盐碱胁迫下的渗透稳态。综上, 盐碱胁迫下青海湖裸鲤*ACSL*基因家族成员均在渗透调节组织上调表达, 这与虹鳟在缺氧胁迫下通过上调*ACSL1a/1b*促进脂质代谢的供能策略相似^[33], 表明*ACSL*基因家族在应对环境压力变化中引发的能量消耗策略在进化上具有保守性。

盐碱胁迫造成的渗透压波动与离子失衡也可能诱发免疫应激^[34], 鱼体内免疫调节因子会发生动态变化以响应外界环境压力, 进而调控炎症水平并维持生理稳态。研究表明, *ACSL4*通过改变磷脂中多不饱和脂肪酸的比例及释放促炎因子(PGE2、P53), 显著增强巨噬细胞的吞噬活性与促炎功能, 从而放大炎症信号^[35, 36]。这是因为*ACSL4*催化脂肪酸反应的底物偏好是长链多不饱和脂肪酸(如花生四烯酸、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸), 而含有PUFA的磷脂可增加膜的流动性, 进而促进巨噬

细胞的吞噬活性^[37, 38]。特异性敲除*ACSL4*证实能够起到抑制炎症的作用, 在炎症调控中发挥关键作用^[39, 40]。本研究结果显示, 盐碱胁迫下青海湖裸鲤肌肉中*ACSL4a*和*ACSL4b*显著上调, 表明盐碱胁迫可能通过脂代谢通路激活促炎途径。然而, 张海琛等^[14]发现盐碱胁迫下青海湖裸鲤的部分免疫防御基因显著下调, 这可能反映机体在长期胁迫下为减少能量消耗而抑制部分免疫应答, 同时通过上调*ACSL4*等脂代谢相关基因增强基础炎症防御, 提示盐碱胁迫对免疫系统的复杂影响。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Watkins P A, Maignel D, Jia Z, *et al.* Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome [J]. *Journal of Lipid Research*, 2007, **48**(12): 2736–2750.
- [2] Piccini M, Vitelli F, Bruttini M, *et al.* *FACL4*, a new gene encoding long-chain acyl-CoA synthetase 4, is deleted in a family with alport syndrome, elliptocytosis, and mental retardation [J]. *Genomics*, 1998, **47**(3): 350–358.
- [3] Li L O, Klett E L, Coleman R A. Acyl-CoA synthesis, lipid metabolism and lipotoxicity [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2010, **1801**(3): 246–251.
- [4] De Carvalho C C C R, Caramujo M J. The various roles of fatty acids [J]. *Molecules*, 2018, **23**(10): 2583.
- [5] Soupene E, Kuypers F A. Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2008, **233**(5): 507–521.
- [6] Mashek D G, Bornfeldt K E, Coleman R A, *et al.* Revised nomenclature for the mammalian long-chain acyl-CoA synthetase gene family [J]. *Journal of Lipid Research*, 2004, **45**(10): 1958–1961.
- [7] Lopes-Marques M, Cunha I, Reis-Henriques M A, *et al.* Diversity and history of the long-chain acyl-CoA synthetase (*AcsI*) gene family in vertebrates [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2013(13): 271.
- [8] Li L J, Luo W, Chen P Y, *et al.* Study on the physiological responses and tolerance mechanisms to subchronic carbonate alkalinity exposure in the gills of *Paramisgurnus dabryanus* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2024(287): 117319.
- [9] Wang R X, Bu Y K, Xing K F, *et al.* Integrated analysis of transcriptome and metabolome reveals chronic low salinity stress responses in the muscle of *Exopalaemon carinicauda* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2024(52): 101340.
- [10] Wu X F, Xu H F, Zeng N X, *et al.* Luteolin alleviates depression-like behavior by modulating glycerophospholipid metabolism in the hippocampus and prefrontal

- cortex of LOD rats [J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2024, **30**(3): e14455.
- [11] Wei X F, Liu Y J, Li S W, *et al.* Stress response and tolerance mechanisms of NaHCO_3 exposure based on biochemical assays and multi-omics approach in the liver of crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2023(253): 114633.
- [12] Shang X C, Geng L W, Wei H J, *et al.* Analysis revealed the molecular mechanism of oxidative stress-autophagy-induced liver injury caused by high alkalinity: integrated whole hepatic transcriptome and metabolome [J]. *Frontiers in Immunology*, 2024(15): 1431224.
- [13] Cheng Y, Zhao J, Ayisi C L, *et al.* Effects of salinity and alkalinity on fatty acids, free amino acids and related substance anabolic metabolism of Nile tilapia [J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2022, **7**(4): 389-395.
- [14] Zhang H C, Ma Q H, Xu B K, *et al.* Screening and analysis of the osmotic, immune, metabolic related genes of *Gymnocypris przewalskii* in saline-alkali tolerance [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2023, **47**(12): 19-38. [张海琛, 马清花, 许保可, 等. 青海湖裸鲤盐碱耐受过程中的渗透、免疫、代谢相关基因筛选和分析 [J]. 水产学报, 2023, **47**(12): 19-38.]
- [15] A L L, Zhang Y J, Xu B K, *et al.* Comprehensive analyses of annexins in naked carp (*Gymnocypris przewalskii*) unveil their roles in saline-alkaline stress [J]. *Aquaculture*, 2024(579): 740175.
- [16] Xu B K, Cui Y R, A. L L, *et al.* Transcriptomic and proteomic strategies to reveal the mechanism of *Gymnocypris przewalskii* scale development [J]. *BMC Genomics*, 2024, **25**(1): 140.
- [17] Chen C J, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, **13**(8): 1194-1202.
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.
- [19] Glasauer S M, Neuhauss S C. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2014, **289**(6): 1045-1060.
- [20] Jaillon O, Aury J-M, Brunet F, *et al.* Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype [J]. *Nature*, 2004, **431**(7011): 946-957.
- [21] Lien S, Koop B F, Sandve S R, *et al.* The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization [J]. *Nature*, 2016, **533**(7602): 200-205.
- [22] Kumar R, Islinger M, Worthy H, *et al.* The peroxisome: an update on mysteries 3.0 [J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2024, **161**(2): 99-132.
- [23] Force A, Lynch M, Pickett F B, *et al.* Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations [J]. *Genetics*, 1999, **151**(4): 1531-1545.
- [24] Berthelot C, Brunet F, Chalopin D, *et al.* The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates [J]. *Nature Communications*, 2014(5): 3657.
- [25] Chang Y M, Liang L Q. Advances of research of physiological and molecular mechanisms related to alkali-saline adaptation for fish species inhabiting alkali-saline water [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, **45**(5): 798-812. [常玉梅, 梁利群. 耐盐碱鱼类的生理和分子机制研究进展 [J]. 水产学报, 2021, **45**(5): 798-812.]
- [26] Takei Y, Hwang P P. Homeostatic responses to osmotic stress [J]. *Fish Physiology*, 2016(35): 207-249.
- [27] Kültz D. Physiological mechanisms used by fish to cope with salinity stress [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2015, **218**(Pt 12): 1907-1914.
- [28] Huang J, Wang S Y, Li W, *et al.* Identification, expression, and evolution of *slc26* gene family in *Leuciscus waleckii* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2023, **30**(3): 309-323. [黄晶, 王双毅, 李雯, 等. 瓦氏雅罗鱼 *slc26* 基因家族的鉴定、表达与进化分析 [J]. 中国水产科学, 2023, **30**(3): 309-323.]
- [29] Evans D H, Piermarini P M, Choe K P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste [J]. *Physiological Reviews*, 2005, **85**(1): 97-177.
- [30] Gilmour K M. New insights into the many functions of carbonic anhydrase in fish gills [J]. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2012, **184**(3): 223-230.
- [31] Hu J, Ye L, Wu K C, *et al.* Effects of acute salinity stress on serum cortisol concentration and $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity in juvenile *Amphiprion clarkii* [J]. *South China Fisheries Science*, 2016, **12**(2): 116-120. [胡静, 叶乐, 吴开畅, 等. 急性盐度胁迫对克氏双锯鱼幼鱼血清皮质醇浓度和 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATP酶活性的影响 [J]. 南方水产科学, 2016, **12**(2): 116-120.]
- [32] Cornelius F. Modulation of Na , K -ATPase and Na -ATPase activity by phospholipids and cholesterol. I. Steady-state kinetics [J]. *Biochemistry*, 2001, **40**(30): 8842-8851.
- [33] Ma F, Zou Y L, Ma L F, *et al.* Evolution, characterization, and immune response function of long-chain acyl-CoA synthetase genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under hypoxic stress [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2022(260): 110737.
- [34] Geven E J W, Klaren P H M. The teleost head kidney: integrating thyroid and immune signalling [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, **66**(1): 73-83.
- [35] Kuwata H, Nakatani E, Shimbara-Matsubayashi S, *et al.* Long-chain acyl-CoA synthetase 4 participates in the

- formation of highly unsaturated fatty acid-containing phospholipids in murine macrophages [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, **1864**(11): 1606-1618.
- [36] Wan G M, Yang Y, Li M H, *et al.* Research progress of the biological and pathological functions of long-chain acyl-CoA synthetase 4 [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2023, **35**(7): 894-902. [万根萌, 杨旸, 李梦焕, 等. 长链酰基辅酶A合成酶4的生物学及病理学功能研究进展 [J]. 生命科学, 2023, **35**(7): 894-902.]
- [37] Shimbara-Matsubayashi S, Kuwata H, Tanaka N, *et al.* Analysis on the substrate specificity of recombinant human acyl-CoA synthetase ACSL4 variants [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2019, **42**(5): 850-855.
- [38] Calder P C, Bond J A, Harvey D J, *et al.* Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis [J]. *The Biochemical Journal*, 1990, **269**(3): 807-814.
- [39] Killion E A, Reeves A R, El Azzouny M A, *et al.* A role for long-chain acyl-CoA synthetase-4 (ACSL4) in diet-induced phospholipid remodeling and obesity-associated adipocyte dysfunction [J]. *Molecular Metabolism*, 2018(9): 43-56.
- [40] Singh A B, Kan C F K, Kraemer F B, *et al.* Liver-specific knockdown of long-chain acyl-CoA synthetase 4 reveals its key role in VLDL-TG metabolism and phospholipid synthesis in mice fed a high-fat diet [J]. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 2019, **316**(5): E880-E894.

GENOMIC ANALYSIS OF THE ACSL GENE FAMILY IN THE *GYMNOCYPRIS PRZEWALSKII* AND ITS RESPONSE TO SALINE-ALKALI STRESS

ZHANG Yu-Jing^{1,2}, CUI Yan-Rong^{1,2}, YAN Lu-Yang², ZHANG Luo-Dan^{1,2}, WANG Tong-Gang^{1,2},
WEI Shu-Jin², WEI Fu-Lei¹, YU Lu-Xian³ and LIANG Jian²

(1. College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, China; 2. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, China; 3. The Rescue and Rehabilitation Center of Naked Carps in Qinghai Lake, Xining 810016, China)

Abstract: This study delves into the significance of the long-chain acyl-CoA synthetase (ACSL) gene family in *Gymnocypris przewalskii* under saline-alkaline stress, conducting bioinformatics analysis on the genome data and exploring saline-alkaline responses through gene expression detection. The results showed that nine ACSL gene family members encoding proteins ranging from 640 to 834 amino acids. Despite notable differences in gene structure, motif and domain analysis showcased a high level of conservation among these members. Chromosome mapping revealed the dispersion of ACSL gene family members across nine chromosomes (Chr8, 13, 15, 40, 41, 48, 64, 82, and 87), all encoding hydrophilic properties. Except for ACSL2 and ACSL3a, the rest are stable proteins. The product of ACSL4b is an acidic protein, while all others are basic. Subcellular localization prediction results indicated that ACSL2 is localized to the cytoplasm, ACSL3a, ACSL3b, ACSL4a, and ACSL4b to the peroxisome, and the rest to the cell membrane. qRT-PCR analysis revealed tissue-specific expression patterns of ACSL genes in *Gymnocypris przewalskii*, with ACSL3b, ACSL4b, and ACSL5 being highly expressed in the kidney, while ACSL3a, ACSL4a, and ACSL5 exhibited elevated expression in the intestine. Under saline-alkali stress, high level expression of ACSL2, ACSL3a, and ACSL6 was detected in the gill, and transcription of ACSL1a, ACSL2, ACSL3a, and ACSL5 were markedly up-regulated in the kidney. In the intestine, expressions of ACSL3b and ACSL6 were prominently up-regulated. These findings highlight the ACSL gene family in *Gymnocypris przewalskii* contributes to multiple physiological functions under saline-alkaline stress, including energy supply through lipid metabolism, maintenance of osmotic balance, and immune regulation.

Key words: Long-chain acyl-CoA synthetase; Saline-alkali stress; Gene family; *Gymnocypris przewalskii*