

绿尾唇鱼 *bace2* 基因的克隆、序列分析、表达与亚细胞定位*

王秋生¹, 连滢滢¹, 姜天宇¹, 左陈鹏¹, 王永波², 齐鑫¹, 李 昀¹, 温海深^{1**}

(1. 海水养殖教育部重点实验室(中国海洋大学), 山东 青岛 266003;

2. 海南省海洋与渔业科学院 海南省热带海水养殖技术重点实验室, 海南 海口 571126)

摘 要: 绿尾唇鱼(*Cheilinus chlorourus*)为南海海域重要的经济鱼类,作为肉食性无胃鱼类,绿尾唇鱼不表达胃蛋白酶原基因,为探究 β 位点淀粉样前体蛋白裂解酶 2(Beta-secretase 2, BACE2)是否在绿尾唇鱼中具有水解食物蛋白的功能,本文采用序列特征分析、生物信息学分析和原位杂交技术对绿尾唇鱼 *bace2* 基因进行了探究。研究显示:绿尾唇鱼 *bace2* 开放阅读框(Open reading frame, ORF)长度为 1 530 bp,编码 509 个氨基酸;BACE2 蛋白在鲈形目物种间呈现较高保守性,绿尾唇鱼 BACE2 蛋白与波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)和鳊(*Siniperca chuatsi*)等鲈形目物种具有较高的同源性;预测绿尾唇鱼 BACE2 蛋白的相对分子质量为 55.27 kDa,等电点为 5.10,属于稳定的亲水性蛋白,具有信号肽和 2 个跨膜结构域,具有 3 个潜在的 N-糖基化位点和 6 个潜在的 O-糖基化位点,二级结构以无规则卷曲为主;qRT-PCR 分析显示,*bace2* 基因在肠道中的相对表达量最高;原位杂交显示,绿尾唇鱼 *bace2* 在小肠绒毛和隐窝区域中广泛表达;亚细胞定位显示,BACE2 主要定位在细胞膜上。研究结果表明,绿尾唇鱼 *bace2* 可能由小肠绒毛细胞分泌,并在细胞外的蛋白质水解中起重要作用,研究结果可为绿尾唇鱼消化生理的进一步研究和人工配合饲料开发提供参考。

关键词: 绿尾唇鱼; *bace2* 基因; 蛋白水解; 消化生理; 无胃鱼类

中图法分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2026)01-029-12

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20240337

引用格式: 王秋生, 连滢滢, 姜天宇, 等. 绿尾唇鱼 *bace2* 基因的克隆、序列分析、表达与亚细胞定位[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2026, 56(1): 29-40.

Wang Qiusheng, Lian Yingying, Jiang Tianyu, et al. Cloning, bioinformatic analysis, expression and subcellular localization of *Cheilinus chlorourus bace2* gene[J]. Periodical of Ocean University of China, 2026, 56(1): 29-40.

绿尾唇鱼(*Cheilinus chlorourus*)隶属于鲈形目(Perciformes)隆头鱼科(Labridae)唇鱼属(*Cheilinus*)^[1-2],广泛分布于印度洋-太平洋暖水域,栖息于礁砂混合的珊瑚礁海域中。绿尾唇鱼肉质细腻绵软,味道鲜美,深受民众喜爱。

胃腺是重要的消化器官。在有胃鱼类中,胃位于食道后方,通过远端的括约肌(即瓣膜)与肠道分离,调节食物向肠道的运输^[3]。在消化过程中,胃暂时储存食物并分泌胃酸和胃蛋白酶。胃蛋白酶隶属于天冬氨酸蛋白酶家族,胃主细胞分泌的胃蛋白酶原经过胃液中的盐酸等因子激活后具有水解蛋白活性,在脊椎动物胃消化过程中起作用^[4]。与胃蛋白酶类似, β 位点淀粉样前体蛋白裂解酶 2(Beta-secretase 2, BACE2)是一种跨膜天冬氨酸蛋白酶,以非活性酶原形式分泌,在酸性条件下催化激活^[5]。BACE2 与胃蛋白酶同属天冬

氨酸蛋白酶家族的 A1 家族^[6],在人胰岛 β 细胞中表达水平较高,参与人胰岛淀粉样多肽(hIAPP)的水解加工^[7]。因此,推测 BACE2 可能在绿尾唇鱼中参与蛋白质水解,在消化过程中起着重要作用。

本文主要研究无胃且不编码胃蛋白酶原基因的绿尾唇鱼。绿尾唇鱼是一种肉食性鱼类,食道直接与肠道相连,胃腺已经退化,没有幽门盲囊,属于典型的无胃鱼^[8]。与典型的植食性无胃鱼类不同,绿尾唇鱼是一种肉食性鱼类,其消化道相对较短。由于其特殊的消化系统结构,绿尾唇鱼在消化蛋白质方面可能具有独特的机制。目前,国内外对绿尾唇鱼的研究集中在生物学特征和进化地位等方面^[9-10],其消化生理学研究相对空白。因此,针对其蛋白质消化相关的酶类,不仅有助于理解其消化生理,还对未来饲料开发和优化具有重要的实际应用意义。

* 基金项目:海南省重点研究发展计划项目(ZDYF2023XDNY037)资助

Supported by the Hainan Province Key Research and Development Program Project(ZDYF2023XDNY037)

收稿日期:2024-10-29; 修订日期:2025-04-09

作者简介:王秋生(2000—),男,硕士生。E-mail: 21220511048@stu.ouc.edu.cn

** 通信作者:温海深,男,教授,研究方向:鱼类繁殖生理、鱼类生殖调控与品种改良。E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验用鱼和实验样品的采集

实验用鱼购自海南省海洋与渔业科学院,选择发育良好、规格相似的5尾成年雌性绿尾唇鱼(体长 (19.24 ± 0.85) cm,体质量 (295.56 ± 62.62) g),在暂养池中暂养2 d,暂养池内径长4.5 m,内径宽3 m,水深1 m,水温维持在 (28 ± 1) °C,每天进行换水和投喂石斑鱼配合饲料。取样前一天停止投喂,使用甲烷磺酸三卡因(MS-222)麻醉,解剖采集肠、脾、脑、肾脏、性腺、肝、肌肉组织,使用4%多聚甲醛固定切片样品, RNA样品放入液氮快速冷冻后放入-80 °C冰箱保存备用,各组织均为5个生物学重复($n=5$)。

1.2 绿尾唇鱼 *bace2* 基因的克隆

使用 TRIzol 试剂(Invitrogen,美国)从绿尾唇鱼肠组织中提取总 RNA,使用 BD-1000 核酸分析仪(五洲东方,北京)检测 RNA 浓度和质量,并通过1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,使用 PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa,日本)试剂盒将所得 RNA 反转录为 cDNA 用于实时定量 PCR,使用 SPARKscript II RT Plus Kit(with gDNA Eraser)试剂盒(思科捷,山东)将 RNA 反转录为 cDNA 用于基因克隆,并于-20 °C中保存。

NCBI 数据库中未收录绿尾唇鱼基因组数据,因此通过亲缘关系较近的波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)基因组数据(ASM1832078v1)得到 *bace2* 基因序列,使用 Primer 5 软件设计 *bace2* 上下游基因特异性引物(F: CGGTGCTGGCGTCTTTA; R: GGTTCGTG-CACGCTGT-CG)。以绿尾唇鱼肠组织 cDNA 为模板,使用 2×Phanta Max Master Mix(Dye Plus)高保真酶(诺唯赞,中国)进行 PCR 扩增。反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳,使用 TIANgel Midi Purification Kit(天根,中国)试剂盒进行琼脂糖凝胶回收,送至生工生物公司测序。PCR 反应体系:2×Phanta Max Master Mix 25 μL, ddH₂O 17 μL, 上、下游引物各 2 μL, cDNA 4 μL。PCR 扩增程序:95 °C 预变性 3 min, 95 °C 下变性 15 s, 56 °C 下退火 15 s, 72 °C 下延伸 2 min, 共 35 个循环。

使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒(诺唯赞,南京)将 PCR 纯化产物连接至实验室改造的 pcDNA3.1 线性载体(以 pcDNA3.1 为骨架,将其改造为 pcDNA3.1-C 端-绿色荧光蛋白 mNG(NCBI 号: AGG56535.1)标签载体),转入感受态细胞 DH5α 中过夜培养。使用 2×Taq PCR Master Mix II(天根,中国)试剂盒进行菌液 PCR。PCR 反应体系:2×Taq PCR Master Mix 10 μL, ddH₂O 7.4 μL, 上、下游引物各

0.8 μL, 菌液 1 μL。PCR 反应程序:94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环。挑选阳性克隆送至生工生物公司测序。

1.3 绿尾唇鱼 *bace2* 基因的序列分析

从 NCBI 数据库中下载不同物种的 *bace2* 基因序列和氨基酸序列,使用 ORF finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测 *bace2* 所编码的氨基酸序列;使用 DNAMAN 9 对氨基酸序列进行对比分析;使用 MEGA 11.0 构建系统进化树。使用 ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)在线预测其理化性质;使用 ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>)预测其亲(疏)水性;使用 SignalP 5.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)预测其信号肽序列;使用 TMHMM 2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)预测其跨膜结构域;使用 NetPhos 3.1(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>)预测其磷酸化位点;使用 NetNGlyc 1.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>)预测其 N-糖基化位点;使用 YinOYang 1.2(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/YinOYang-1.2/>)预测其 O-糖基化位点;使用 PSORT II(<https://psort.hgc.jp/form2.html>)预测其亚细胞定位;使用 SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20_sopma.html)预测其二级结构;使用 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)预测其三级构型。

1.4 绿尾唇鱼 *bace2* 基因的组织分布

使用 Primer 5 软件设计 *bace2* 基因上下游特异性引物(F: TGCAGTGAACGGGGAAATCA; R: AGG-GCGTAGGATATCACCCA),以 β -actin(F: GATGT-CACGCACGATTTC; R: TGCTGTCCCTGTATG-CCTCT)作为内参基因,以反转录合成的 cDNA 为模板,进行 qPCR 分析。使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(诺唯赞,中国)对绿尾唇鱼全组织进行相对表达量的检测。qPCR 通过 Stepone™ Real-Time PCR 仪(ABI)进行,每个反应设置三次技术重复。qPCR 反应体系为:2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 5 μL, ddH₂O 2.6 μL, 上、下游引物各 0.2 μL, cDNA 2 μL。qPCR 反应程序为:预变性 95 °C, 30 s;变性 95 °C, 10 s;退火 60 °C, 30 s, 进行 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对试验数据进行分析。

1.5 *bace2* mRNA 的原位杂交定位

使用 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)(Roche, 瑞士)根据 *bace2* 基因序列合成地高辛(DIG)标记的正

反义 RNA 探针,并在上游引物 5'端添加保护碱基和 SP6 聚合酶启动子 (ATTTAGGTGACACTAT-AGAAGCG),在下游引物 5'端添加保护碱基和 T7 聚合酶启动子 (TAATACGACTCACTATAGGGAGACA),合成的探针长度约 500 bp。原位杂交探针引物见表 1。

表 1 原位杂交探针引物
Table 1 Probe primers for *in situ* hybridization

引物 Primer	序列(5'—3') Nucleotide sequence(5'—3')
ISH- <i>bace2</i> F	CGCATTTAGGTGACACTATAGAAG CGAACTGGGAAGGTGAACTCGG
ISH- <i>bace2</i> R	CCGTAATACGACTCACTATAGGGA GACAGATCAGAGATCCGCGTGTGA

取绿尾唇鱼肠组织,使用 4%的多聚甲醛固定后进行石蜡包埋并切片,将切片固定至载玻片,37 °C 干燥。使用二甲苯浸泡载玻片两次,每次 10 min;使用 100%、95%、85%、70%的梯度浓度乙醇溶液依次浸泡 3 min;在摇床上使用 1×PBS 冲洗 5 min;使用 0.1 mol/L HCl 冲洗 8 min,灭活内源碱性磷酸酶,使用 1×PBS 摇床冲洗 5 min;使用蛋白酶 K(10 μg/mL)在 37 °C 烘箱中处理 5 min;使用 1×PBS 洗涤 5 min 去除蛋白酶 K;使用含有 0.25%醋酸酐的三乙醇胺(TEA)溶液摇床处理 10 min,使用 2×SSC 洗涤 10 min。

载玻片上滴加 200 μL 杂交缓冲液,55 °C 预杂交 1 h;将含有 RNA 探针的杂交缓冲液置于 95 °C 中变性 5 min 后置于冰中冷却,滴加在载玻片覆盖组织,55 °C 杂交过夜。第二天使用 5×、2×、1×和 0.2×的梯度浓度 SSC 和 MABT 缓冲液依次洗涤载玻片;使用封闭缓冲液(Roche,瑞士)进行封闭处理;使用碱性磷酸酶结合的抗地高辛抗体(Roche Diagnostics)检测地高辛,使用 NBT/BCIP 储备液(Roche,瑞士)在黑暗条件下进行显色,完成后在荧光显微镜(Echo Revolve,美国)下观察记录。

1.6 BACE2 蛋白的亚细胞定位

将 1.2 步骤中测序正确的菌液扩培,使用无内毒素质粒小提试剂盒(TIANGEN,北京)提取目标质粒,该质粒用于细胞转染。使用 10%胎牛血清(爱必信,上海)、1%青霉素-链霉素双抗母液(100×)(金克隆,北京)、89% DMEM 培养基(白鲨,安徽)配制完全培养基。取液氮保存的 HEK 293T 细胞系,于 37 °C 水浴解冻,120g 离心 4 min,弃去上清,重悬,接种于培养瓶,37 °C 5% CO₂ 培养细胞。待细胞完全铺满培养瓶后进行传代,培养至第三代且生长状态良好时用于转染。

将细胞消化、离心,用完全培养基重悬后接种至 35 mm 玻底共聚焦培养皿(白鲨,安徽)中。待细胞密度为 60%~70%时,使用转染试剂 Lipo8000TM(碧云天,上海)转染 HEK 293T 细胞,48 h 后观察拍照^[11-14]。

1.7 数据处理分析

所有数据均以平均值±标准误差(Mean±S. E. M.)表示。数据分析采用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析,然后进行 Duncan 多重比较, $P<0.05$ 表示差异具有统计学显著性,使用 GraphPad Prism 9.0 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 绿尾唇鱼 *bace2* 基因序列特征及系统进化树

绿尾唇鱼 *bace2* 开放阅读框(Open reading frame, ORF)长度为 1 530 bp,编码 509 个氨基酸(见图 1)。氨基酸序列多重比对显示,绿尾唇鱼 BACE2 氨基酸序列与波纹唇鱼(*Cheilinus undulatus*)、鳊(*Siniperca chuatsi*)和欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)同源性较高,一致性分别为 93.21%、83.58%和 83.02%,绿尾唇鱼 BACE2 与其他硬骨鱼的同源性高于哺乳类和两栖类(见图 2)。

为了进一步分析 BACE2 的进化关系,本研究构建了系统进化树。该进化树主要分为两支,哺乳类和两栖类占一支,鱼类一支,而鱼类的 BACE2 又分为两支。绿尾唇鱼 BACE2 与鳊、尖吻鲈(*Lates calcarifer*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)等聚为一支,具有较高的同源性,这一聚类结果符合绿尾唇鱼的分类学地位(见图 3)。

2.2 BACE2 蛋白的生物信息学分析

绿尾唇鱼 BACE2 蛋白化学式为 C₂₄₈₈H₃₈₈₆N₆₄₂O₇₃₈S₂₁,分子质量为 55.27 kDa,等电点为 5.10;脂肪系数为 99.37。该蛋白在哺乳动物体外网织红细胞的半衰期为 30 h。绿尾唇鱼 *bace2* 基因编码 509 个氨基酸,其中带负电荷氨基酸残基 44 个,带正电荷氨基酸残基 33 个;氨基酸的组成中亮氨酸(Leu)含量最高,占比为 11.4%(见表 2),不稳定系数为 35.22,表明该蛋白性质稳定。

ProtScale 在线工具预测显示,绿尾唇鱼 BACE2 蛋白平均亲水指数为 0.238,属于亲水性蛋白,在第 477 位谷氨酸处疏水性最强(3.384),在第 498 位组氨酸处亲水性最强(-1.768)(见图 4(A))。TMHMM 2.0 Server 在线软件预测显示,绿尾唇鱼 BACE2 蛋白具有 2 个跨膜结构(见图 4(B)),这与亲(疏)水性预测一致,BACE2 为跨膜蛋白,主要功能区域在膜外。SignalP 5.0 在线软件预测结果显示,绿尾唇鱼 BACE2 多肽前端预测信号肽含有 23 个氨基酸(见图 1),信号肽的作用为引导前体蛋白进入内质网。

```

1  ATG GCA AAT AGT CCT TCT CTG GTG ATA CAG GCG TTA GCT TTA AGT TTA TGC TTC GTA GTA
1  M  A  N  S  P  S  L  V  I  Q  A  L  A  L  S  L  C  F  V  V
61  TCC AAG TGT TTA TTT TCC ATA CCG CTC CAA GTA AAT TCA GGG AAG TTC AAC CTT TCC TCT
21  S  K  C  L  F  S  I  P  L  Q  V  N  S  G  K  F  N  L  S  S
121  GCG GTG GAT TTG ACT CCT GTG CAG CAA GTC ATG TTA AAG TCT GAT GGA AAC AGC CTC TCC
41  A  V  D  L  T  P  V  Q  Q  V  M  L  K  S  D  G  N  S  L  S
181  TTG GCT TCT GAT CCC ACG GGA ACC GTC AAC TTT CTG GAC ATG GTC AAC AAC TTA CAA GGA
61  L  A  S  D  P  T  G  T  V  N  F  L  D  M  V  N  N  L  Q  G
241  GAC TCT GGG AGA GGC TAT TAC ATC GAG ATG TCC CTT GGT ACC CCT GAG CAA AAG CTG AAC
81  D  S  G  R  G  Y  I  E  M  S  L  G  T  P  E  Q  K  L  N
301  ATC CTG GTT GAT ACA GGC AGC AGT AAC TTT GCC GTG GCA GCG TCT GCA CAC CCT TTC ATT
101  I  L  V  D  T  G  S  S  N  F  A  V  A  A  S  A  H  P  F  I
361  ACT CAC TAC TTC AAC ACT GCT CTC TCC ACT ACA TAT GAG TCA ACC GAC CGG ACT GTG ACG
121  T  H  Y  F  N  T  A  L  S  T  T  Y  E  S  T  D  R  T  V  T
421  GTC AGG TAC ACC CAG GGT AAC TGG GAA GGT GAA CTG GGC ATC GAC CAC GTC TCC CTC CCC
141  V  R  Y  T  Q  G  N  W  E  G  E  L  G  I  D  H  V  S  L  P
481  AAA GGC CCT AAT GGA ACC ATC ATC GTC AAC ATA GCT GCC ATC CTC TCC TCG GAT GGC TTT
161  K  G  P  N  G  T  I  I  V  N  I  A  A  I  L  S  S  D  G  F
541  TTC CTT CCC GGG GTC AAC TGG CAG GGC ATC CTT GGA CTG GCC TAT CCC ATG CTG GCA AGG
181  F  L  P  G  V  N  W  Q  G  I  L  G  L  A  Y  P  M  L  A  R
601  CCG GAC TCA TCT GTG GAA CCA TTT TTC AAC TCC ATG GTG AGA CAG CTG GGC ATT CCC GAC
201  P  D  S  S  V  E  P  F  N  S  M  V  R  Q  L  G  I  P  D
661  ATC TTC TCC CTC CAG ATG TGT GGA GCT GGA CTG TCG GCC AGC ACA GCA GAC GAT GCA
221  I  F  S  L  Q  M  C  G  A  G  L  S  A  S  S  T  A  D  V  A
721  GGA GGC AGC TTT ATC ATG GGA GGG ACT GAG CCC ACT CAG TAC CTC GGA TCA GTG TGG TAC
241  G  G  S  F  I  M  G  G  T  E  P  T  Q  Y  L  G  S  V  W  Y
781  ACC CCC ATA GTA GAG GAA TGG TAC TAC CAA GTA GAA GTT TTG AAG CTG GAA GTC GGG GAC
261  T  P  I  V  E  E  W  Y  Y  Q  V  E  V  L  K  L  E  V  G  D
841  CAG AAT CTG GAC CTG GAC TGC CGG GAG TAT AAC ATG GAT AAA GCT ATA GTT GAC AGT GGG
281  Q  N  L  D  L  D  C  R  E  Y  N  M  D  K  A  I  V  D  S  G
901  ACG ACA CTG CTG CGT CTT CCT GTC AAC GTC TTC AAT GCC GTG GTG GCA GCC ATC ACA CGC
301  T  T  L  L  R  L  P  V  N  V  F  N  A  V  V  A  A  I  T  R
961  GGA TCT CTG ATC CAG GAG TTT TCT TCA GGG TTC TGG GAG GGT ACA AAG CTT GCA TGC TGG
321  G  S  L  I  Q  E  F  S  S  G  F  W  E  G  T  K  L  A  C  W
1021  ATA AAG GGA GAG ACC CCC TGG AGG TTT TTC CCT AAG CTG TCC ATC TAC CTG AGA GCA ACG
341  I  K  G  E  T  P  W  R  F  F  P  K  L  S  I  Y  L  R  A  T
1081  AAC ACC AGC CAG TCA TTT CGC ATC ACC ATC CTG CCA CAG CTT TAC ATT CAG CCA ATC ACA
361  N  T  S  Q  S  F  R  I  T  I  L  P  Q  L  Y  I  Q  P  I  T
1141  GAT GTG GAT GGC ACT TTA GAC TGC TAC CGC TTT GGC GTG TCT TCG TCA TCT AAT GGC CTG
381  D  V  D  G  T  L  D  C  Y  R  F  G  V  S  S  S  N  G  L
1201  GTC ATA GGT GCT ACT GTC ATG GAG GGC TTC TAC GTG GTG TTT GAC CGT TCC AAA CGG AGA
401  V  I  G  A  T  V  M  E  G  F  Y  V  V  F  D  R  S  K  R  R
1261  CTA GGG TTC GCA TTA AGC AGT TGT GCA GTG AAC GGG GAA ATC ACT CTG TCA GAG ATT GCA
421  L  G  F  A  L  S  S  C  A  V  N  G  E  I  T  L  S  E  I  A
1321  GGG CCC TTC TCG GCT GCA GAT GTG GCG TCC AAT TGT TCT GGT GGG CCA CTG AAG GAG CCT
441  G  P  F  S  A  A  D  V  A  S  N  C  S  G  G  P  L  K  E  P
1381  CTC CTC TGG GTG ATA TCC TAC GCC CTC ATG GCG GTC TGC GCC TTT GTC CTT GTC ATC CTG
461  L  L  W  V  I  S  Y  A  L  M  A  V  C  A  F  V  L  V  I  L
1441  CTA CTC CTT TTA GTC CTA CCC TGC CGA CGC AGA CAC CAC TCA GGG GAG ATA ACC GAT GAG
481  L  L  L  L  V  L  P  C  R  R  R  H  H  S  G  E  I  T  D  E
1501  TCC TCG CTG GTT CGT CAC CGT ATC AAG TGA
501  S  S  L  V  R  H  R  I  K  *

```

(橙色方框内的字母表示预测的信号肽序列,蓝色方框内的字母表示预测的跨膜序列,紫色方框内的字母表示预测的6个O-糖基化位点,绿色方框内的字母表示3个N-糖基化位点。The letters in the orange box indicates the predicted signal peptide, the letters in the blue box indicates the predicted transmembrane sequence, the letter in the purple box indicates the predicted O-glycosylation sites, and the letter in the green box indicates the predicted N-glycosylation sites.)

图1 绿尾唇鱼 *bace2* 基因核苷酸序列及所编码氨基酸序列

Fig. 1 The nucleotide and amino acid sequence of *bace2* gene in *Cheilinus chlorurus*

NetPhos 3.1 在线软件预测结果显示,绿尾唇鱼 BACE2 蛋白中丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化位点分别为 35、15 和 6 个(见图 5(A))。NetNGlyc 1.0 在

线软件预测结果显示,绿尾唇鱼 BACE2 蛋白存在 3 个潜在的 N-糖基化位点,分别位于第 37、164、361 位氨基酸处(见图 5(B));YinOYang 1.2 在线软件预测结果

显示,绿尾唇鱼 BACE2 蛋白存在 6 个潜在的 O-糖基化位点,分别位于第 4、203、204、363、394 和 444 位氨基酸处(见图 5(C))。SOPMA 在线软件预测结果显示,绿尾唇鱼 BACE2 蛋白二级结构中 α -螺旋、延伸链、无规则卷曲和 β -转角分别占 16.70%、27.11%、51.47% 和 4.72%(见图 5(D))。SWISS-MODEL 在线软件预

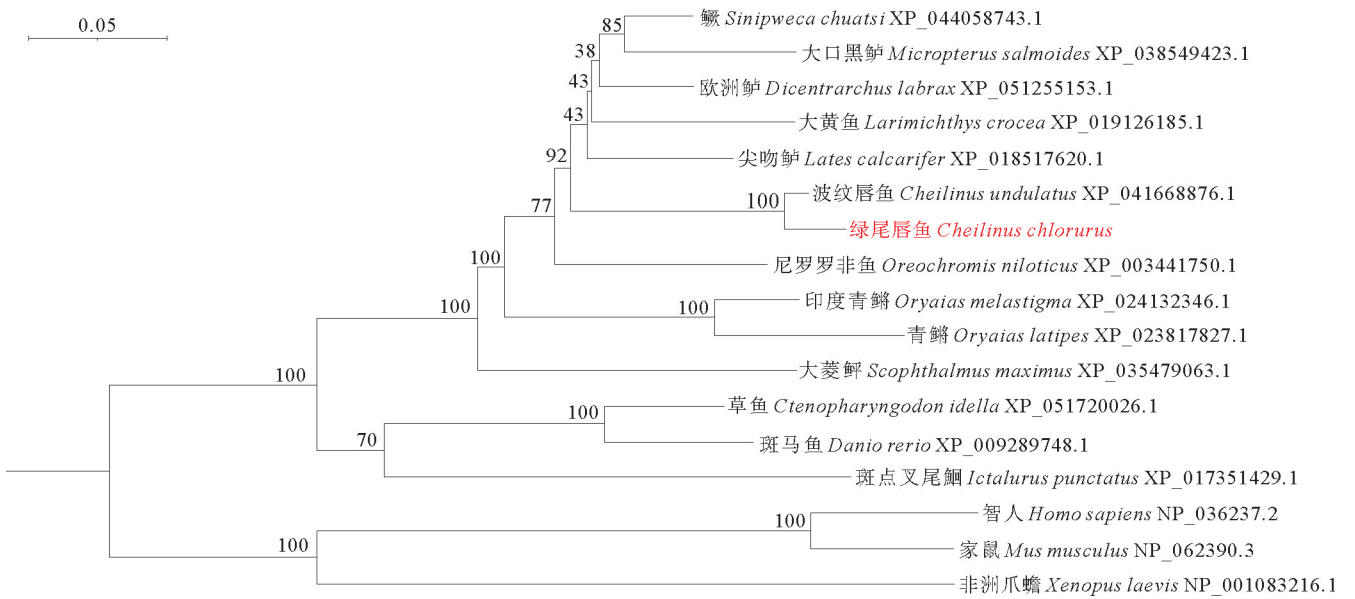
测表明,绿尾唇鱼 BACE2 蛋白三级结构大部分为无规则卷曲且具有明显的 α -螺旋结构(见图 5(E)),三级结构与二级结构预测结果相符。PSORT II 在线软件预测结果显示,绿尾唇鱼 BACE2 蛋白主要分布在质膜(47.80%)、内质网(26.10%)和液泡(8.70%)中,线粒体和高尔基等细胞器中也有分布。



(*Homo sapiens*: 智人, NP_036237; *Mus musculus*: 小鼠, NP_062390. 3; *Xenopus tropicalis*: 非洲爪蟾, NP_001135590. 1; *Danio rerio*: 斑马鱼, XP_056329513. 1; *Lates calcarifer*: 尖吻鲈, XP_018517620. 1; *Cheilinus undulatus*: 波纹唇鱼, XP_041668876. 1; *Siniperca chuatsi*: 鳊, XP_044058743. 1。黑色背景表示相似性为 100%, 粉色背景表示相似性 > 75%, 蓝色背景表示相似性 > 50%。 *Homo sapiens*: Human, NP_036237; *Mus musculus*: Mouse, NP_062390. 3; *Xenopus tropicalis*: African clawed frog, NP_001135590. 1; *Danio rerio*: Zebrafish, XP_056329513. 1; *Lates calcarifer*: Silver sea perch, XP_018517620. 1; *Cheilinus undulatus*: Giant wrasse, XP_041668876. 1; *Siniperca chuatsi*: Aucheniperch, XP_044058743. 1. The black background indicates that the consistency is 100%, the pink background indicates that the consistency is greater than or equal to 75%, the blue background indicates that the consistency is greater than or equal to 50%.)

图 2 绿尾唇鱼与其他物种的 BACE2 蛋白氨基酸序列比较

Fig. 2 Comparison of deduced amino acid sequences of BACE2 protein in *Cheilinus chlorurum* with other species



(横向枝干长度表示两个物种在进化上的累积遗传差异;节点数为自展值,表示进化树分支的可信度;各物种的氨基酸序列来源位于图片物种的括号中。
The horizontal branch length represents the accumulated genetic differences between species during evolution; the number at each node indicates the bootstrap value, reflecting the confidence level of the evolutionary tree branches; the amino acid sequences of each species are indicated in parentheses following the species names in the figure.)

图3 基于17种脊椎动物BACE2氨基酸序列的Neighbor-Joining进化树
Fig.3 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on 17 BACE2 protein sequences of vertebrates

表2 绿尾唇鱼BACE2蛋白氨基酸的组成
Table 2 Amino acid composition of BACE2 protein in Cheilinus chlorourus

氨基酸 Amino acids	数量 Number	频率 Frequency/%	氨基酸 Amino acids	数量 Number	频率 Frequency/%
亮氨酸 Leu (L)	58	11.4	谷氨酸 Glu (E)	21	4.1
丝氨酸 Ser (S)	53	10.4	精氨酸 Arg (R)	20	3.9
缬氨酸 Val (V)	43	8.4	谷氨酰胺 Gln (Q)	17	3.3
甘氨酸 Gly (G)	42	8.3	酪氨酸 Tyr (Y)	16	3.1
丙氨酸 Ala (A)	34	6.7	赖氨酸 Lys (K)	13	2.6
异亮氨酸 Ile (I)	31	6.1	甲硫氨酸 Met (M)	11	2.2
苏氨酸 Thr (T)	31	6.1	半胱氨酸 Cys (C)	10	2.0
苯丙氨酸 Phe (F)	25	4.9	色氨酸 Trp (W)	8	1.6
脯氨酸 Pro (P)	24	4.7	组氨酸 His (H)	6	1.2
天冬酰胺 Asn (N)	23	4.5	吡咯赖氨酸 Pyl (O)	0	0.0
天冬氨酸 Asp (D)	23	4.5	硒代半胱氨酸 Sec (U)	0	0.0

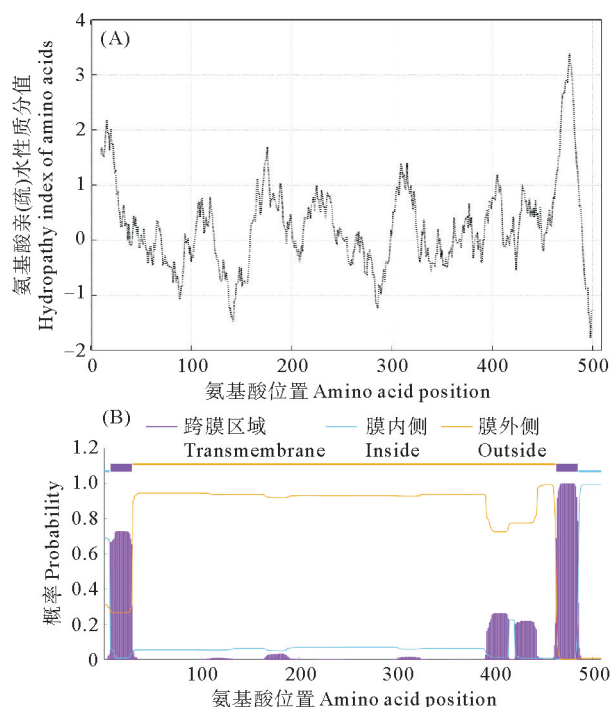
2.3 bace2 基因在绿尾唇鱼各组织中的相对表达

采用实时荧光定量 PCR 技术检测了 bace2 基因在绿尾唇鱼肠道、肾、脾、脑、肌肉、肝及性腺中的相对表达量。结果显示,bace2 基因在肠道中的相对表达量最高,在脾脏中的相对表达量最低,肠道的 bace2 基因相对表达量显著高于其他组织($P<0.05$),是脾脏的 32 倍;肝脏的 bace2 基因相对表达量显著高于肌肉、肾和脾脏($P<0.05$);性腺的 bace2 基因相对表达量与肝脏

相近;脑的 bace2 基因相对表达量约为脾脏的 15 倍,显著高于脾脏和肾($P<0.05$);肌肉的 bace2 基因相对表达量约为脾脏的 10 倍,肾和脾脏的 bace2 基因相对表达量较低。

2.4 bace2 mRNA 的原位杂交定位

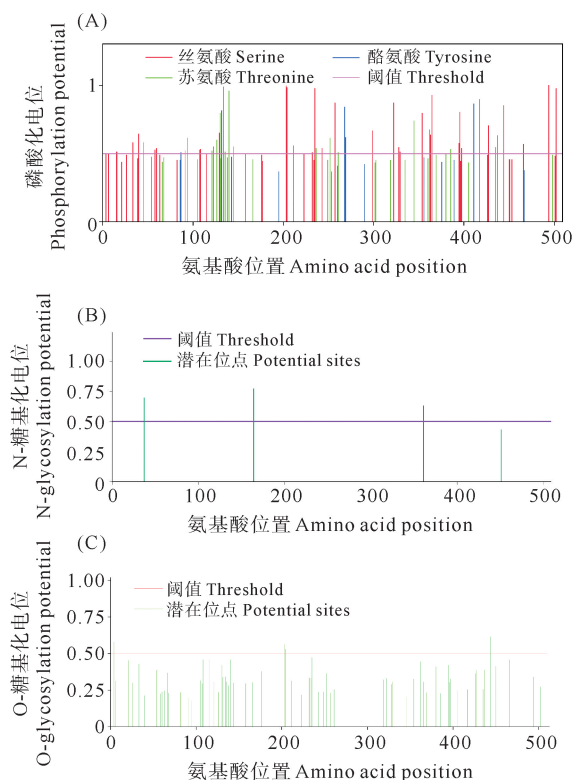
为了确定 bace2 在肠道中的表达分布,通过原位杂交检测 bace2 的 mRNA 在绿尾唇鱼肠组织中的表达分布。结果表明,在反义探针处理的切片(见图7(A)、



(在图(A)中,分值为正表示疏水区域,分值为负表示亲水区域。In panel (A), a positive score means a hydrophobic region, and a negative score means a hydrophilic region.)

图4 绿尾唇鱼 BACE2 蛋白亲(疏)水性预测(A)和跨膜结构预测(B)

Fig. 4 Hydrophilicity and hydrophobicity prediction(A) and transmembrane domain prediction(B) of BACE2 protein in *Cheilinus chlorourus*



(D: Helix; Sheet; Turn; Coil; 无规则卷曲。D: Helix: Alpha helix; Sheet: Extended chain; Turn: Beta turn; Coil: Random coil.)

图5 绿尾唇鱼 BACE2 蛋白磷酸化位点(A), N-糖基化(B), O-糖基化位点(C), 二级结构(D)和三级结构(E)预测

Fig. 5 Prediction of phosphorylation site (A), N-glycosylation sites (B), O-glycosylation sites (C), secondary structure prediction (D) and tertiary structure prediction (E) of BACE2 protein in *Cheilinus chlorourus*

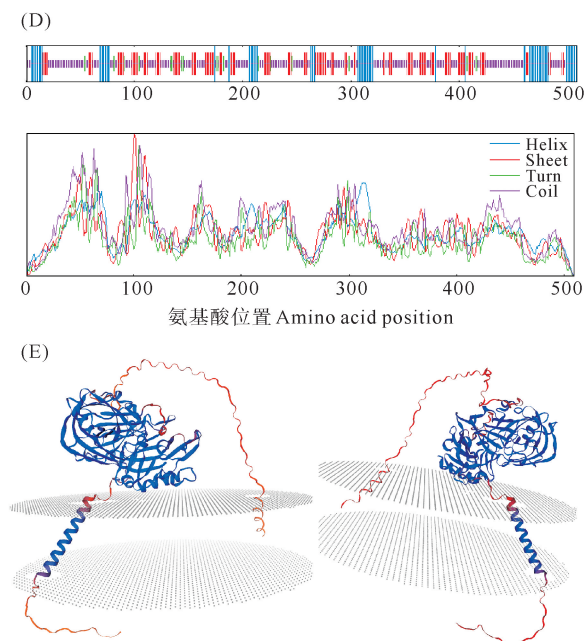
7(B)、7(C))中, *bace2* 在小肠绒毛和隐窝区域呈现明显的阳性信号。相较之下, 正义探针处理的切片(见图 7(D)、7(E)、7(F))未检测到明显的杂交信号。

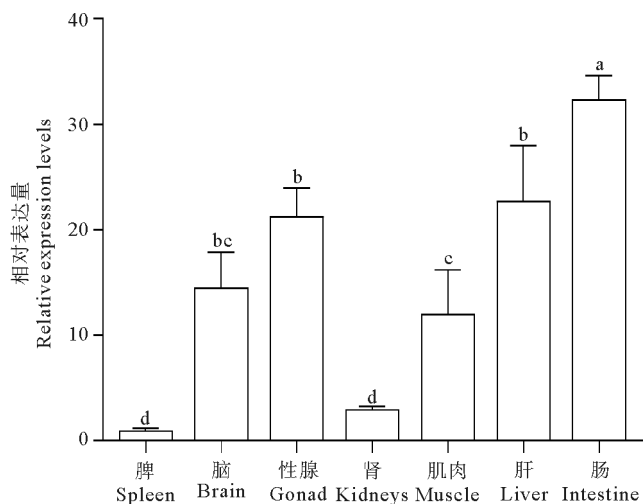
2.5 BACE2 蛋白的亚细胞定位分析

在 HEK 293T 细胞系中转入空载质粒(mNG)和表达 *bace2* 基因的质粒(BACE2-mNG), 培养 48 h 后使用共聚焦显微镜拍照。亚细胞定位结果表明, 转入 mNG 质粒的细胞绿色荧光信号主要集中于细胞质中, 未观察到与特定细胞器或膜结构共定位; 转入 BACE2-mNG 质粒的绿色荧光信号主要聚集在细胞膜上(见图 8)。与转入 mNG 的细胞相比, 转入 BACE2-mNG 质粒的绿色荧光信号有显著的定位变化。

3 讨论

胃是颌口动物的消化器官之一, 通过分泌胃酸和胃蛋白酶原行使消化功能。胃酸由胃质子泵分泌, 胃质子泵是一种 $\alpha\beta$ 异二聚体结构的 H^+/K^+-ATP 酶, 分别由 *ATP4A* 和 *ATP4B* 基因编码 α 亚基和 β 亚基^[15]。而胃蛋白酶原是胃消化功能的基础, 在酸性条件下被激活, 通过水解特定的肽键将蛋白质消化成为更小的肽段或氨基酸^[16-17], 提高生物体对蛋白质的利用效率, 例如胃蛋白酶原 A、胃蛋白酶原 B、胃蛋白酶原 F、前胃素和凝乳酶原等^[4]。研究表明, 胃首次出现在 4.5 亿年前的有颌类脊椎动物中^[3], 但胃在颌口动物中





(标有不同字母者表示组间有显著性差异($P < 0.05$), 标有相同字母者表示组间无显著性差异($P > 0.05$)。The means with different letters are significantly different in the groups at the 0.05 probability level, and the means with the same letter are not significant differences.)

图6 *bace2* 基因在绿尾唇鱼各组织中的表达分布

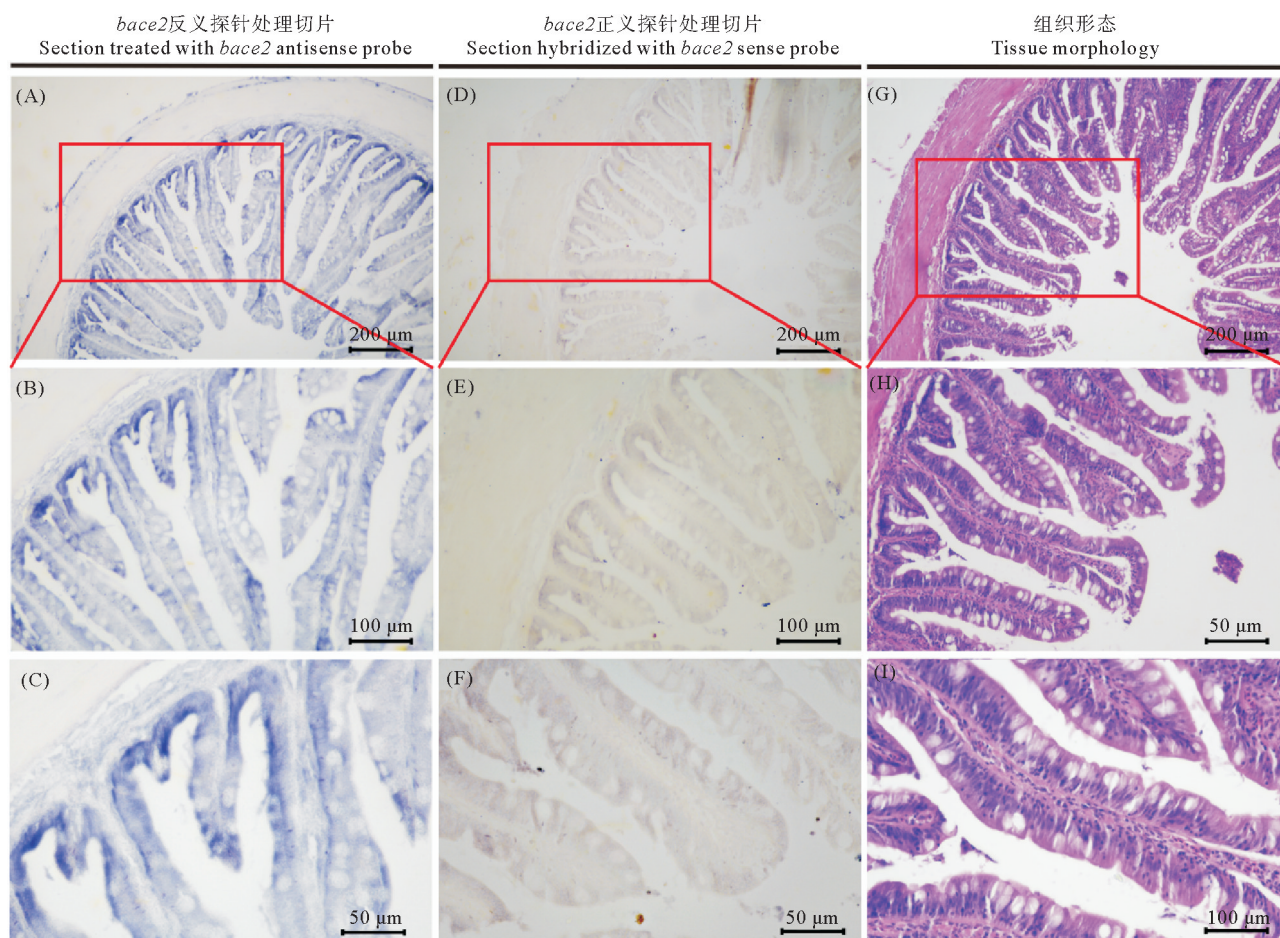
Fig. 6 Expression distribution of the *bace2* gene in various tissues of *Cheilinus chlorourus*

并不普遍存在。根据鱼类是否具有胃结构可以将其分为有胃鱼和无胃鱼, 目前已知的无胃鱼有鲤形目、鲱形目、鲑形目和隆头鱼目等。硬骨鱼在进化过程中出现了相互独立的多次胃结构丢失, 比较基因组学分析发现胃结构丢失伴随着与胃酸及胃蛋白酶相关的基因丢失或失活^[16]。

目前针对 BACE2 功能的研究较少。在哺乳动物的研究中, BACE1 和 BACE2 同属于天冬氨酸蛋白酶家族成员, 氨基酸序列相似性达 64%, 是密切的同源物^[18-20]。BACE2 的功能研究主要集中在阿尔茨海默病(AD)^[18] 和 2 型糖尿病(T2D)^[7] 的发病机制。BACE2 普遍表达于外周分泌组织中, 如胰岛、胃和甲状腺等, 其在胰腺 β 细胞中的相对表达量最高^[5], 在 β 细胞水解加工 Tmem27 蛋白^[21]。此外, BACE2 还作为 β -分泌酶, 通过裂解 β -淀粉样蛋白前体蛋白(APP) 产生 β -淀粉样蛋白(A β) 发挥作用。

3.1 绿尾唇鱼 *bace2* 基因的序列特征及进化分析

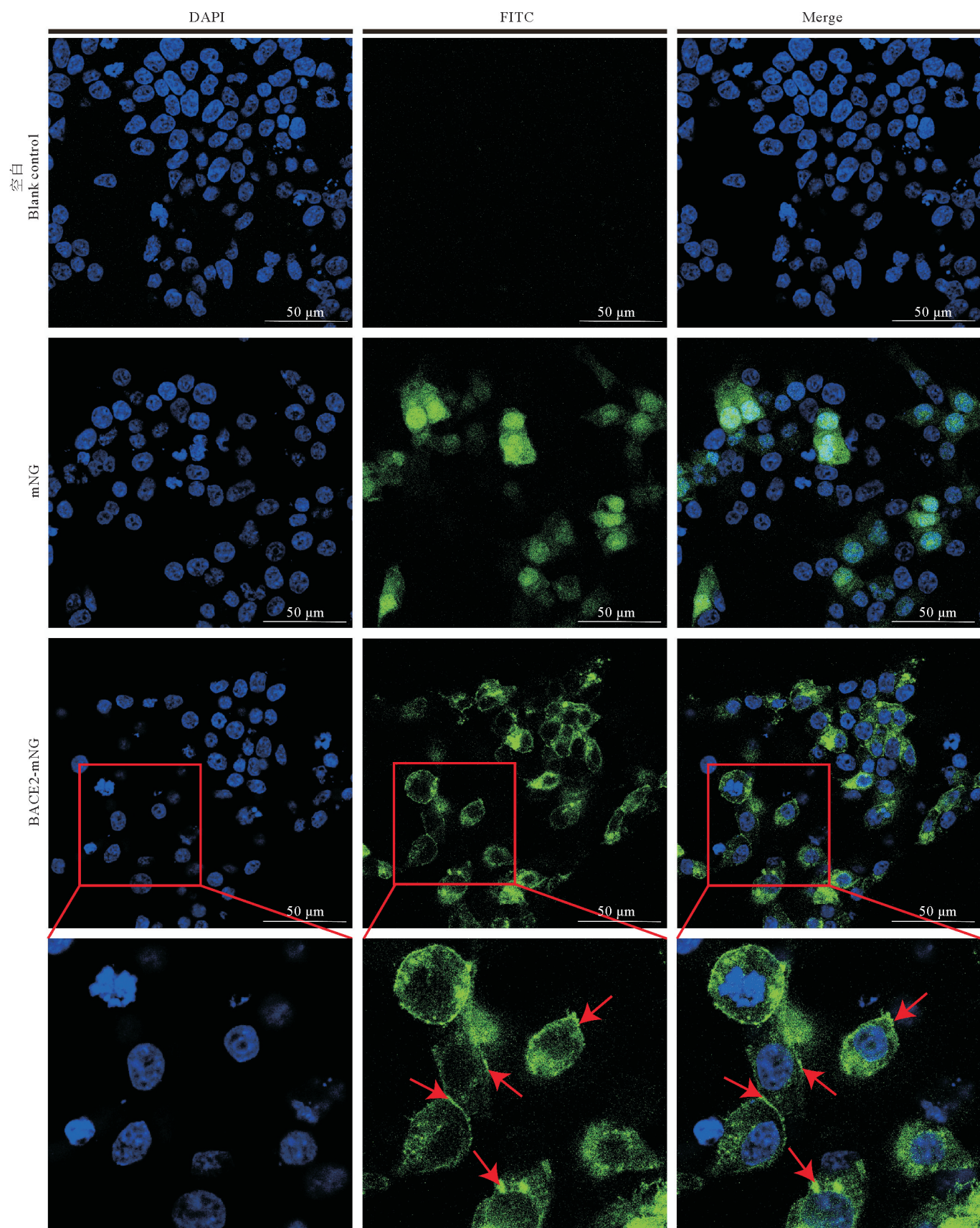
绿尾唇鱼作为典型的无胃鱼, 其胃部结构(包括胃腺)退化, 食道直接与肠道相连, BACE2 是否在其消化



(图中蓝色为 *bace2* 的杂交信号。Blue for hybridization signals of *bace2*.)

图7 *bace2* 在小肠绒毛中的阳性信号(A)、(B)、(C), *bace2* 在小肠绒毛中的阴性信号(D)、(E)、(F)和小肠绒毛的 HE 染色(G)、(H)、(I)

Fig. 7 Positive signal of *bace2* in intestinal villus (A)、(B)、(C) negative signal of *bace2* in intestinal villus (D)、(E)、(F) and HE staining of intestinal villus (G)、(H)、(I)



((DAPI(蓝色)显示细胞核,FITC(绿色)代表 BACE2 mRNA 信号,合并图像显示 DAPI 与 FITC 信号的重叠分布。红色箭头表示 BACE2 蛋白在细胞膜上定位。DAPI (blue) indicates nuclei, and FITC (green) represents BACE2 mRNA signal, merge image shows the overlap of DAPI and FITC signals. The red arrows indicate the localization of BACE2 protein on the cell membrane.))

图 8 BACE2 蛋白在 HEK 293T 中的亚细胞定位

Fig. 8 Subcellular localization of the BACE2 protein in HEK 293T cells

系统中发挥作用尚不明确。本研究采用基因克隆的方法得到了绿尾唇鱼 *bace2* 基因的 cDNA 序列并预测了氨基酸序列,进化树分析表明绿尾唇鱼 BACE2 与来自鲈形目鱼类 BACE2 的相似程度较高,多重序列对比进一步揭示绿尾唇鱼 BACE2 蛋白与近缘物种波纹唇鱼的同源性最高。BACE2 具有信号肽序列,是一种跨膜蛋白,第 30 至第 462 号氨基酸均在膜外,占据全部氨基酸序列的 73% 以上,二级结构以无规则卷曲为主。研究表明,BACE2 的催化结构域位于膜外,其膜外区域的蛋白酶结构域具有催化活性,负责切割底物^[22-23],去除 BACE2 的膜外区域会显著削弱其对底物的切割能力,而删除细胞质部分则不影响,这表明膜外区域是 BACE2 与底物相互作用的基础^[4]。因此,推测绿尾唇鱼 BACE2 蛋白具有天冬氨酸型内肽酶活性,作用于肽键,在细胞外行使消化功能,主要在蛋白水解过程中发挥作用。

3.2 *bace2* 基因的表达特征

BACE2 是 BACE 蛋白酶家族的一员,在哺乳动物中具有裂解蛋白质的功能,通过对胰岛素前体或其他特定底物的加工,在代谢、神经功能中发挥重要作用^[21,23]。qPCR 结果显示,*bace2* 基因在绿尾唇鱼肠道中的表达量显著高于其他组织。肠是绿尾唇鱼进行食物分解、营养吸收和代谢调控的关键部位,这一表达模式可能与 BACE2 发挥的作用相关,作为一种蛋白酶,BACE2 可能作用于蛋白,促进食物蛋白质的分解。

通过 *bace2* mRNA 原位杂交对绿尾唇鱼肠组织进行检测,结果表明,*bace2* 基因在小肠绒毛和隐窝中大量表达。小肠绒毛表面覆盖柱状上皮细胞,扩大了吸收面积,通过钠-葡萄糖协同转运体等机制主动吸收葡萄糖、氨基酸等营养物质^[24]。小肠隐窝中的细胞直接或间接参与消化功能,隐窝底部的分泌细胞可以分泌氯化物和碳酸氢盐,维持肠的酸碱平衡^[24],隐窝底部具有大量干细胞,可以不断分裂并分化为多种功能细胞,其分化产生的腺体细胞可以直接分泌消化酶;杯状细胞可以分泌黏液保护肠壁免受损伤和润滑食物^[25];内分泌细胞可以分泌激素,如胆囊收缩素、促胰液素等,这些激素可以调节胰腺和胆囊的分泌,间接促进食物的消化^[26]。原位杂交结果表明,绿尾唇鱼 BACE2 蛋白可能由小肠绒毛和小肠隐窝细胞合成,在蛋白质的消化过程中发挥重要作用。

亚细胞定位显示,BACE2 蛋白主要定位在细胞膜,这与其生物信息学预测的结构特性一致。在哺乳动物中,BACE2 属于 β -分泌酶家族,作为跨膜蛋白表达于细胞膜上,适于与胞外基质中的底物蛋白相互作用^[27-28]。结合其相对定量及原位杂交定位结果,推测 BACE2 可能参与肠道的消化功能,通过裂解特定蛋白

质以进行消化或维持肠道环境稳态,肠道上皮细胞膜上的一些酶类和转运蛋白也具有类似作用^[29],BACE2 在细胞膜上的分布表明其可能与膜表面底物蛋白如黏附蛋白、肠道相关酶前体的裂解加工相关。

本研究预测了 BACE2 的理化性质,验证了 *bace2* 基因在绿尾唇鱼肠道组织中的位置和在细胞中的定位,推测 BACE2 蛋白在绿尾唇鱼肠道中发挥蛋白质水解功能。

4 结论

(1)绿尾唇鱼 *bace2* 基因开放阅读框长度为 1 530 bp,编码 509 个氨基酸,在不同物种中较为保守,BACE2 蛋白是一种跨膜蛋白,主要功能域位于膜外。

(2)绿尾唇鱼 *bace2* 基因在肠道中的相对表达量最高,且在小肠绒毛和隐窝区域广泛表达,其表达主要定位于细胞膜,推测 BACE2 蛋白在肠道中发挥蛋白质水解功能,参与食物蛋白质的水解过程。

参考文献:

- [1] 陈大纲,张美昭. 中国海洋鱼类[M]. 青岛:中国海洋大学出版社,2015:1501-1502.
Chen D G, Zhang M Z. Marine Fishes of China[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2015: 1501-1502.
- [2] 伍汉霖,钟俊生. 中国海洋及河口鱼类系统检索[M]. 北京:中国农业出版社,2021:305-306.
Wu H L, Zhong J S. Key to Marine and Estuarial Fishes of China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021: 305-306.
- [3] Wilson J M, Castro L F C. Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes[M]// Fish Physiology. [S. l.]: United States Academic Press, 2010, 30: 1-55.
- [4] Kageyama T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: Structure, function, evolution, and development[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2002, 59(2): 288-306.
- [5] Bennett B D, Babu-Khan S, Loeloff R, et al. Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(27): 20647-20651.
- [6] Uniacke-Lowe T, Fox P F. Chymosin, pepsins and other qspartyl proteinases: Structures, functions, catalytic mechanism and milk-clotting properties[M]// Cheese. Oxford, UK: Elsevier Academic Press, 2017: 69-113.
- [7] Rulifson I C, Cao P, Miao L, et al. Identification of human islet amyloid polypeptide as a BACE2 substrate[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0147254.
- [8] Kurokawa T, Uji S, Suzuki T. Identification of pepsinogen gene in the genome of stomachless fish, *Takifugu rubripes*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 140(1): 133-140.
- [9] Asriyana A, Irawati N, Halili H. Length-weight relationships and ponderal index of three reef fish (Teleostei: Labridae) off the Tanjung Tiram coast, Southeast Sulawesi, Indonesia[J]. Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 2020, 21(4): 1279-1286.

- [10] Sarhan M, Azab A M, Khalaf-Allah H M M, et al. DNA barcoding supports sexual dimorphism in two Labrid species; *Cheilinus lunulatus* and *Halichoeres hortulanus* (Family Labridae) in Red Sea, Egypt[J]. The Egyptian Journal of Aquatic Research, 2019, 45(4): 395-401.
- [11] 王子睿, 王昱杰, 周泽斌, 等. 斑马鱼 *notch1a* 和 *notch1b* 对 *hsp70* 基因的调控作用[J]. 水生生物学报, 2024, 48(5): 829-838.
Wang Z R, Wang Y J, Zhou Z B, et al. Regulation of *hsp70* gene by *notch1a* and *notch1b* in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2024, 48(5): 829-838.
- [12] 李铁, 李佳慧, 宁丽峰, 等. PS1/GFP 融合蛋白对 PS1 的亚细胞定位的初步研究[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(6): 17-22.
Li T, Li J H, Ning L F, et al. Studies of function and cellular distribution of PS1 using PS1/GFP fusing protein[J]. China Biotechnology, 2006, 26(6): 17-22.
- [13] 丁少青, 周泽斌, 王雅倩, 等. 东北七鳃鳗 *TRAF6* 基因克隆、表达分析及亚细胞定位研究[J]. 水生生物学报, 2019, 43(1): 9-16.
Ding S Q, Zhou Z B, Wang Y Q, et al. Molecular cloning, expression analysis and subcellular localization of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 in Korean lamprey, *Lethenteron morii* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(1): 9-16.
- [14] Chen K, Tian J, Wang J, et al. Lipopolysaccharide-induced TNF α factor (LITAF) promotes inflammatory responses and activates apoptosis in zebrafish *Danio rerio* [J]. Gene, 2021, 780: 145487.
- [15] Shin J M, Munson K, Vagin O, et al. The gastric HK-ATPase: Structure, function, and inhibition[J]. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2008, 457(3): 609-622.
- [16] Esfandiyari K, Pfeifer L J, Farahani M A, et al. The gastric proton pump in gobiid and mudskipper fishes. Evidence of stomach loss? [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2022, 274: 111300.
- [17] Castro L F, Goncalves O, Mazan S, et al. Recurrent gene loss correlates with the evolution of stomach phenotypes in gnathostome history[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2014, 281(1775): 20132669.
- [18] Wang Z, Xu Q, Cai F, et al. BACE2, a conditional β -secretase, contributes to Alzheimer's disease pathogenesis[J]. JCI Insight, 2019, 4(1): e123431.
- [19] Mirsafian H, Mat Ripen A, Merican A F, et al. Amino acid sequence and structural comparison of BACE1 and BACE2 using evolutionary trace method [J]. The Scientific World Journal, 2014, 2014: 482463.
- [20] Taylor H A, Przemyńska L, Clavane E M, et al. BACE1: More than just a beta-secretase [J]. Obesity Reviews, 2022, 23(7): e13430.
- [21] Esterhazy D, Stutzer I, Wang H, et al. Bace2 is a beta cell-enriched protease that regulates pancreatic beta cell function and mass [J]. Cell Metabolism, 2011, 14(3): 365-377.
- [22] Rochin L, Hurbain I, Serneels L, et al. BACE2 processes PMEL to form the melanosome amyloid matrix in pigment cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(26): 10658-10663.
- [23] Farzan M, Schnitzler C E, Vasilieva N, et al. BACE2, a beta-secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(17): 9712-9717.
- [24] Binder H J, Brown I, Ramakrishna B S, et al. Oral rehydration therapy in the second decade of the twenty-first century [J]. Current Gastroenterology Reports, 2014, 16(3): 376. DOI: 10.1007/s11894-014-0376-2.
- [25] Duangnumsaeng Y, Zentek J, Goodarzi Boroojeni F. Development and functional properties of intestinal mucus layer in poultry [J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 745849.
- [26] Gierynska M, Szulc-Dabrowska L, Struzik J, et al. Integrity of the intestinal barrier: The involvement of epithelial cells and microbiota—a mutual relationship [J]. Animals, 2022, 12(2): 145. <https://doi.org/10.3390/ani12020145>.
- [27] Dominguez D, Tournoy J, Hartmann D, et al. Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice [J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(35): 30797-30806.
- [28] Vassar R, Bennett B D, Babu-Khan S, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE [J]. Science, 1999, 286(5440): 735-741.
- [29] Kiela P R, Ghishan F K. Physiology of intestinal absorption and secretion [J]. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2016, 30(2): 145-159.

Cloning, Bioinformatic Analysis, Expression and Subcellular Localization of *Cheilinus chlorourus bace2* Gene

Wang Qiusheng¹, Lian Yingying¹, Jiang Tianyu¹, Zuo Chenpeng¹,
Wang Yongbo², Qi Xin¹, Li Yun¹, Wen Haishen¹

(1. Key Laboratory of Mariculture (Ocean University of China), Ministry of Education, Qingdao 266003, China;
2. Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Maricultural Technologies, Hainan Academy of Ocean and Fisheries
Sciences, Haikou 571126, China)

Abstract: *Cheilinus chlorourus* is an important economic fish species in South China Sea. As a carnivorous fish species lacking stomach, *C. chlorourus* does not express the pepsinogen gene. In this study, to investigate whether the β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 2 (BACE2) functions in hydrolyzing food proteins in *C. chlorourus*, we employed several analytical techniques. We utilized sequence feature analysis to characterize the gene structure, bioinformatic analysis to predict protein function, and *in situ* hybridization to assess gene expression patterns of the BACE2 gene in *C. chlorourus*. The results showed that *bace2* has an open reading frame (ORF) of 1 530 bp, encodes 509 amino acids. The BACE2 is highly conserved in Perciformes. It was highly similar with BACE2 from *C. undulatus* and *Siniperca chuatsi*. The predicted molecular weight of the protein was 55.27 kDa, and its isoelectric point was 5.10. It was a stable, hydrophilic protein with a signal peptide and two transmembrane domains. It also had three possible N-glycosylation sites and six possible O-glycosylation sites. Its secondary structure was mainly random coils. QRT-PCR analysis showed that *bace2* exhibited the highest relative expression level in intestine. *In situ* hybridization showed that *bace2* widely expressed in villi and intestinal crypt. Subcellular localization revealed that BACE2 primarily localized in cell membrane. These results suggested that BACE2 may be secreted by intestinal villus, contributing to the hydrolysis of extracellular proteins. Our findings provided useful information for studying the digestion of *C. chlorourus* and developing better artificial feeds.

Key words: *Cheilinus chlorourus*; *bace2* gene; protein hydrolysis; digestive physiology; stomachless fish

责任编辑 朱宝象