

大口黑鲈两种脂蛋白脂肪酶基因 cDNA 的 克隆及表达特征分析

朱择敏^{1,2}, 马冬梅², 白俊杰^{2*}, 梁旭方¹

(1. 暨南大学生命科学技术学院, 广东 广州 510632;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380)

摘要:为促进肉食性鱼类人工配合饲料开发的理论基础研究,分析鱼类脂肪代谢的机制,实验克隆了大口黑鲈 2 个脂蛋白脂肪酶基因 *LPLtype1* 和 *LPLtype2* 的 cDNA。序列分析表明, *LPLtype1* 基因 cDNA 序列全长 2 156 bp, 编码 516 个氨基酸; *LPLtype2* 基因 cDNA 序列全长 1 710 bp, 编码 346 个氨基酸。大口黑鲈 *LPLtype2* 与 *LPLtype1* 氨基酸序列之间的同源性为 43.5%。系统进化分析表明,大口黑鲈 *LPLtype1* 和鳊 *LPL* 聚为一支,大口黑鲈 *LPLtype2* 和大麻哈鱼 *LPLtype2* 紧密聚为一支。预测分析发现,大口黑鲈 *LPLtype1* 和 *LPLtype2* 基因编码蛋白的活性中心位点、N-糖基化位点、二聚体形成的保守疏水残基位点、肝素结合域等主要功能域与硬骨鱼类和其他脊椎动物对比都比较保守。运用实时定量 PCR 方法检测脂蛋白脂肪酶 mRNA 的组织分布,发现 *LPLtype1* 和 *LPLtype2* 都在肝脏中表达量最高,推测这与肝脏是最重要的营养诱导性储脂部位有关。

关键词:大口黑鲈; 脂蛋白脂肪酶; 组织表达; 肝损伤

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 是我国主要淡水养殖品种之一,为肉食性鱼类,养殖主要靠投喂冰鲜鱼,为了降低大口黑鲈的养殖成本,推进肉食性鱼类标准化养殖的发展,用价格相对便宜、产量更为丰富的植物蛋白源作为饲料的主要成分,开发适口的人工配合鱼饲料,已成为水产养殖业的研究热点之一^[1]。大口黑鲈等肉食性鱼类易患脂肪肝,特别是食用人工饲料时,即使是健康的个体在成长过程中也会有轻微的肝损伤。肝脏是鱼体内最主要的代谢器官之一,其损伤或病变往往导致机体代谢机能紊乱和抗病力降低,极易造成继发传染性疾病和综合征的发生,严重威胁着集约化水产养殖业的持续健康发展^[2]。为了保证生长速度同时减少患脂肪肝的风险,除了关注饲料中脂肪成分对鱼体脂肪代谢的影响并优

化适宜添加量^[2-4],还有必要对饲料中脂肪成分对鱼体脂肪代谢的影响机理作进一步深入地分析。

脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL) 是一种糖蛋白,属于酯酶家族^[5]。LPL 主要催化乳糜微粒和极低密度脂蛋白中的甘油三酯水解,产生供组织利用的脂肪酸和单酰甘油^[6-7]。LPL 能分解卵磷脂、磷脂酰乙醇胺,并促使脂蛋白之间转移胆固醇、磷脂及载脂蛋白,在机体脂质代谢调控上起关键作用^[8-9]。Wion 等^[10]在 1987 年克隆得到人 (*Homo sapiens*) LPL 的 cDNA 全序列,在鱼类中,Oku 等^[11]首次获得了真鲷 (*Pagrus major*) cDNA 序列并对其进行了结构分析,此外,金头鲷 (*Sparus aurata*)^[12]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[13]、欧洲鲈

收稿日期:2012-12-17 修回日期:2013-01-25

资助项目:国家自然科学基金项目(31001107);公益性行业(农业部)科研专项(200903045);国家科技支撑计划(2012BAD26B03)

通信作者:白俊杰, E-mail:jjbai@163.net

(*Dicentrarchus labrax*)^[14]等的 LPL cDNA 也已被克隆。本研究克隆了大口黑鲈 LPL 家族的两个基因 *LPLtype1* 和 *LPLtype2* 的 cDNA, 并分析了两个基因在不同组织中的表达量, 为进一步研究饲料中脂肪的添加量对鱼类各组织脂肪代谢的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验鱼为珠江水产研究所良种基地当年人工繁殖的大口黑鲈, 平均体质量 100 g。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

用 TRIzol (Invitrogen, USA) 快速提取喂食冰鲜鱼大口黑鲈的前肠、中肠、后肠、幽门垂、垂体、肝、脾、胃、心组织总 RNA。将提取的总 RNA 用 DNA 酶 (Promega, USA) 处理后, 以 Oligo (dT) 18 作为反转录引物, 用试剂盒 (TOYOBO, Japan) 将总 RNA 反转录成 cDNA, 总 RNA 提取和 cDNA 合成均按试剂盒推荐方法进行。反转录后的 cDNA 用于组织表达研究。

另构建大口黑鲈肝脏的 SMART cDNA 库, 合成方法按照 SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, USA) 操作手册的说明。

1.3 大口黑鲈 LPL cDNA 的克隆

从本实验室建立的大口黑鲈 EST 库中选取两个 LPL 基因目标片段, 设计引物 (表 1) 并委托英骏生物技术有限公司 (Invitrogen, China) 合成, 用于扩增核心片段, 扩增条件为 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 36 个循环, 最后 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后用 ABI 3730 自动测序仪进行序列测定。根据测得核心片段设计 3'-RACE 和 5'-RACE 特异引物 (表 1), 以 SMART cDNA 为模板, 用 RACE 的方法扩增核心片段的 5' 和 3' 端序列, 纯化后, 连接到 pMD18-T (TaKaRa, China) 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆并测序。

用 Vector NTI suite 8.0 软件对核心序列、5'-RACE 和 3'-RACE 序列进行对比拼接, 得到 *LPLtype1* 和 *LPLtype2* 基因的 cDNA 全序列。

1.4 脂蛋白脂肪酶序列分析和比较

在 GenBank 中搜索同源序列, 人 (NP 000228.1), 鸡 (*Gallus gallus*, JX 090309.1), 野猪 (*Sus scrofa*, AY 559454.1), 小鼠 (*Mus musculus*, AAA 39441.1), 斑马鱼 (*Danio rerio*, NM 131127.1), 鳊 (*Siniperca chuatsi*, EU 719620.1), 点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*, EU 683732.1), 欧洲鲈 (AM 411614.1), 金头鲷 (AY 495672.2), 真鲷 (AB 243791.1), 大麻哈鱼 type 1 (*Oncorhynchus clarkii* type 1, JQ 692134.1), 大麻哈鱼 type 2 (*Oncorhynchus clarkii* type 2, JQ 692135.1), 金枪鱼 (*Thunnus orientalis*, AB 370192.1), 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*, HQ 850701.1), 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*, JQ 690822.1), 草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*, FJ 716100.1), 鲤 (*Cyprinus carpio*, ACN 66301.1), 青鳉 (*Oryzias latipes*, AB 698560.1), 褐菖鲉 (*Sebastes marmoratus*, JQ 663623.1)。

预测分析大口黑鲈 *LPLtype1* 和 *LPLtype2* 基因编码蛋白的二聚体形成位点、N-糖基化位点、活性中心位点、肝素结合域等主要功能域。用 Vector NTI suite 8.0 软件对同源 LPL 氨基酸序列进行比对分析。用 MEGA 5.0 软件构建系统树。

1.5 大口黑鲈脂蛋白脂肪酶 mRNA 的组织分布

用 TRIzol 分别提取大口黑鲈前肠、中肠、后肠、幽门垂、垂体、肝、脾、胃、心的总 RNA。避开大口黑鲈 *LPLtype1* 和 *LPLtype2* 的保守区, 设计用于荧光定量 PCR 扩增的引物 (表 1)。以 18S 作为内参基因, 用 ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪检测 LPL mRNA 在各组织的表达量, 并计算相对表达量。

2 结果

2.1 大口黑鲈 *LPLtype1* 和 *LPLtype2* 基因 cDNA 的克隆

用 RT-PCR 和 SMART-RACE 方法获得了大口黑鲈 *LPLtype1* 和 *LPLtype2* 基因 cDNA 全序列。其中 *LPLtype1* 基因 cDNA 全长 2 156 bp, 开放阅读框 1 551 bp, 编码 516 个氨基酸 (图 1); *LPLtype2* 基因 cDNA 全长 1 710 bp, 开放阅读框 1 041 bp, 编码 346 个氨基酸 (图 2)。

表 1 引物序列
Tab.1 Primers in the current study

引物 primer	序列(5'-3') primer sequence	用途 usage
LPLtype1 F	ATCGTTGTGGACTGGCTGAC	扩增 LPLtype1 核心片段的上游引物
LPLtype1 R	CTTCCAGGTAAGCAAACCTCT	扩增 LPLtype1 核心片段的下游引物
LPLtype2 F	TCGCTCGCTTCATTGACTGG	扩增 LPLtype2 的核心片段的上游引物
LPLtype2 R	CTGAACGATTCACCTTACTGG	扩增 LPLtype2 的核心片段的下游引物
3'LPLtype1	AAGCTTGGCTACAACATCAAC	LPLtype1 3'RACE 扩增的特异引物
3'LPLtype2	AGCGCTCAGTCCACCTGTTTCAT	LPLtype2 3'RACE 扩增的特异引物
5'LPLtype1	CAGCAGATGAATCCTCTC	LPLtype1 5'RACE 扩增的特异引物
5'LPLtype2	CAATCAGGTGGATGTTCT	LPLtype2 5'RACE 扩增的特异引物
LPLtype1 F1	ATACATGGCTGGACGGTAAC	LPLtype1 荧光定量 PCR 扩增上游引物
LPLtype1 R1	GTGAGGTCTCCAGCGATTC	LPLtype1 荧光定量 PCR 扩增下游引物
LPLtype2 F1	CACACAACGTTTCAGATGTACAC	LPLtype2 荧光定量 PCR 扩增上游引物
LPLtype2 R1	CATACAGTGAGACAGTGAGTGAAG	LPLtype2 荧光定量 PCR 扩增下游引物
18SF	GGACACGGAAAGGATTGACAG	内参基因荧光定量 PCR 扩增上游引物
18SR	CGGAGTCTCGTTTCGTTATCGG	内参基因荧光定量 PCR 扩增下游引物

```

1 CGCCACTTCTGTGTTTTAAAAACACAGATTGGATTTACAACCTGGTCTCCCGACATCCACAGAACTTTTATCCAGGATATTTTTAGCA
91 AAAAAACTCAATAATATGGGAAAAGAAAATATCACTTTTTTGACAGTTTGGATAATTTTTGGGAAAATCTTTGCAACTTTTTCTCTGAC
M G K E N I T F L T V W I I L G K I F A T F S S D
181 CCTGAACCCACCACCGACACTGTGTTTGTAAACACCACAGTCACCACTACTCCCTGCCACCAGTCTGAATGGATCACAGACTACACT
P E P T T D T V F V N T T V T T T P L P T T A E W I T D Y T
271 GACATTGTGCCAAGTTCTCCCTCGCCACAGTGGACACCCAGATGATGACATGTGCTACATTGTGGCCGGAGTCCAGAAAACCAATCAAG
D I V S K F S L R T V D T P D D D M C Y I V A G S P E T I K
361 GACTGTGAATCAACTCAGAAAACACAGACCTTCATAGTGATACATGGCTGGACGGTAACAGGGATGTTGAAAAGCTGGTGGCCAAAGCTG
E C E F N S E T Q T F I V I H G W T V T G M F E S W V P K L
451 GTGCTGTCTCTATGAGCGCGAGCCAGTGGCAATGTGATCGTTGTGGACTGGCTGACCCGCGCCAAACAGCACTACCCGACCTCCCGCA
V S A L Y E R E P S A N V I V W D W L T R A N Q H Y P T S A
541 GCCTACACTAACTAGTGGACGCGACGTCGCAAGTTTGTACTTGGCTACAAAACGAGCTGCAGTGGCCCTGGGAGAGGATTCATCTG
A Y T K L V G R D V A K F V T W L Q N E L Q L P W E R I H L
631 CTGGGTTACAGTCTGGGAGCACATGTGGCTGGAATCGCTGGAGACCTCACTGACCATAAAATCAGCAGGATCACAGGTCGGATCCTGCT
L G Y S L G A H V A G I A G D L T D H K I S R I T G L D P A
721 GGTCCACCTTTGAGCACGACAAACAGGACCCCTGTCCAAAGATGACGCCCAGTTTGTGGATGTCCTGCACCAACACCCAGGGCC
G P T F E H A D N Q D T L S K D D A Q F V D V L H T N T R G
811 TCCCGAGCCGAGCATTGGCATCCAGAGACCCGTTGGCCACATCGACATTTACCCCAATGGAGGCACCTTCCAGCCGGGCTGGCAGATC
S P D R S I G I Q R P V G H I D I Y P N G G T F Q P G C D I
901 CAGAATACATTGCTGGGATGCAATGAAAGGCATCAAGGGCCTCCAAAATATGAGCCAGCTTGTCAAATGTTCCATGAGGGCTCCATC
Q N T L L G I A L E G I K G L Q N M D Q L V K C S H E R S I
991 CACCTGTTATCGACTCTCTGCTGAACATCCAGCAGCAGACATGGCCTACCCCTGCAACTCCAAAAGAGGCTTTAACAAGGGTCTGTGC
H L F I D S L L N I Q Q Q S M A Y R C N S K E A F N K G L C
1081 CTCAGCTCAGAAAAGAACCGCTGCAACAAGCTTGGCTACAACATCAACAAGTCCCGCAGGGCCCGCAGCACCAAGATGTACCTCAAGACC
L S C R K N R C N K L G Y N I N K V R R A R S T K M Y L K T
1171 CGTAAATGATGCCATACAAAGTTTTCCACTATCAAGTGAAGGTGCATTTCTTACAGAAAGACCAATGAGCTTCACAGGCAGCCAAATG
R E M M P Y K V F H Y Q V K V H F F S K D Q M S F T E Q P M
1261 AAGATTCTCTGTATGAAACCCAGGAGAGAGGAGGACATCCCTTCCTCCCGGACCTGAAACGGTAACACCACCTTTGCTCTCTCTC
K I S L Y G T H G E K E D I P F V L P D L N G N T T L S F L
1351 ATCACCCTGATGTGGACATCGGAGACCTGATGATGTGAAAGTGTGGCTGGGAGAAAGGACACTATCATCAGCTGCTCAGACTGGTGGGGC
I T T D V D I G D L M I V K L R W E K D T I I S W S D W W G
1441 AGCAGCAAGTCCACATCCGCAAACTGCGCATCAAGTCTGGGAGACCCAGTCCAAAGGTGATCTTTCAGTCAAAAGGATGGAGAGTTTGCT
S S K F H I R K L R I K S G E T Q S K V I F S A K D G E F A
1531 TACCCTGAAAAGGGAGGAGAAAACGCAAGTCTTTGTCAAGTCAAAAAGAGACAAACTGAAACCGTAAAAGAGAAATTTGATGCACAAACTGAAA
Y L E R G G E N A V F V K S K E D K L N R K E K L M H K L K
1621 ATCAGGGCAGTCTTTTTGGCAGAGTGACGCTTGAAGTTGCACTTGTACACGCAAAACGCCCAAGCATCATGCACATCATCCATTCTTAC
M Q G S L F G Q S D A
1711 ATACATAGCCAAAGATAAACTGCACACAGCAACACTGGGAGAGCCCTTTCCAAGTAACTGGACATTTACTGAATGCTGCATTTTTAGATT
1801 TTCTTCCTGTTGTGCCTTATGACTTCAACTCCCAAGTCAACCAACACAACTCTGCCCGCAGTGTGGAAATCAGTCTGCTACAGACTCT
1891 CTCTGTCTCTGCAAAATTTCTGCTGCTGAAAAATGTTACAGGTTTCTTTTGTGATGATGCTCAGCTTTGACAAAATAGACCTTTTGTCT
1981 GCATATCTTTGTAATCATTTGTTTATGCTTTGCAAGCTATATGTACTGTTTATCTGTCTGATGAATTTTGAACCCCTGAACTGGTGTG
2071 TATTCTTGGCAATGTGAACITGGATTATTGTAATATATAAATGATTACAGAGTATAGCCATAATTTAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 大口黑鲈 LPLtype1 基因 cDNA 及其编码氨基酸序列

Fig.1 The cDNA sequence and the deduced amino acid sequence of LPLtype1 gene in *M. salmoides*

```

1   GGGGTCGGGGGAGATATCAGGACTCTACGCCACAGGGACAGGAGGCAGTGGATTTTTACAAAGGTTATATACAGCCTTCTGCTGGGAG
90  AGCTGATCGATTTAATTAAAGTGTCAAAGACATCTTCTCTAAAAGGAAAAGCCTGTAAAAGAAAATGAACGGCGGGCGACTTCAGTTTGTGT
180 ACTTTCGGTGTGAGTGGCCGCTGTGACGTATGTGACGCTCTGGAAAGAGAGCTCGCCGATTCATTTTTGGTAACTTCTCGACCCCTC
270 TGAAAGACAAGGATGACAGCAATCAAACCTTTGCCAAATTCCTCCCTCCGCAAAACCATCTCAACCCGATGACGACCTGTGTACATTGTTC
360 CTGGCAAACCTTGACTCCCTGGCAGCCTGCACCTTCAACAGCACCTCCAAAACCTTCTAATAATCCATGGATGGAGCTTGAGCGGTATGT
450 TTGAAAGCTGGATGCTAAGCTGGTGTACGCCCTATATGAAAGGGAGCAGACAGCTAACGTCATTGTGGTGGACTGGCTCACCTCGGCA
      M K G S R Q L T S L W W D W L T S A
540 CAGAACCCTATGTGGTGGCAGCTCAACAACCAAAAGCAGTGGGACAGGAGATCGCTCGCTTCATTGACTGGATTGAGAAAACCAACAAC
      Q N H Y V V A A H N T K A V G Q E I A R F I D W I E E T T N
630 ATGCCTCTGGAGAACATCCACCTGATTGCTACAGCCTCGGGGCTCATGTGGCTGGATTTGCTGGAAGCCATGCAACAAATAAAGTCGGA
      M P L E N I H L I G Y S L G A H V A G F A G S H A T N K V G
720 AGAATAACTGGTTTGGACCCAGCTGTGCTGACTTTGAGGGGAAACAGCCACAGGCGCTCTCCCTGATGACGCCCACTTTGTGGAC
      R I T G L D P A G P D F E G E H A H R R L S P D D A H F V D
810 GTCCTCCACACTTTCACAGGGCTCCCTTGGTCTCAGCATCGGGATCCAGCAGCTGTGGACATGTAGACATTTACCCCAACGGAGGC
      V L H T F T R G S L G L S I G I Q Q P W G H V D I Y P N G G
900 AGCTTCCAGCCAGGCTGCAACCTCAGGGAGCCCTGGAAAAGATTGCCAACTTTGGGATATTTGCTATCACTGATGCAGTGAAGTGTGAA
      S F Q P G C N L R G A L E K I A N F G I F A I T D A V K C E
990 CACGAGCGCTCAGTCCACCTTTCATCGACTCTCTGCTGAATGAGCAGAAAGCAGCCAAAGGCTACCGATGCGGCAGCAACGACATGTTT
      H E R S W H L F I D S L L N E Q K A A K A Y R C G S N D M F
1080 AACCGCGCATGTGTCTCAGTTGCCGCAAAAGCCGCTGCAACACAGTGGGCTACGACATCAGCAAGGTCGCAAGGCACACACAGTTCAG
      N R G M C L S C R K S R C N T V G Y D I S K V R K A H N V Q
1170 ATGTACAAAAGACGCGCCCTCCATGCCCTTTAGAGTGTACCCTATCAGTGAAGATCCACTTCTCCAGTAAAGTGAATCGTTCAGAG
      M Y T K T R A S M P F R V Y H Y Q L K I H F S S K V N R S E
1260 ATGGAGCCTTCACTCACTGTCTCAGTGTATGGAACAAAAGGGAGGCTGAAAACCTGGAGCTTAAACTAAAGGAGAAAATATCGACAAAT
      M E P S L T V S L Y G T K G E A E N L E L K L K E K I S T N
1350 AAGACTCACTATTCTGCTAGTACGGAGAGGATATCGGATCTCTTGATGTTGAAAGTTTAAATGGGAGGAGACAAACAGTGTGGTCA
      K T H S F L L V T E T D I G D L L M L K F K W E E T N S W S
1440 GCCTCCAACATGTTGAAGATGGTTTCTCTTGGTGGTCCGGTCACTCAGACAGCTCTGACATGGAGGTTTCACAAAATCCGCATCTGAGCC
      A S N M L K M V S S W W S G D S D S S D M E V H K I R I
1530 GGCAGACCCCAAAAAGATGGTGTCTGTGTGAAAAGACCTGAAAATCTGAACCTTAACACAAGAGGTCACATTTGTTAAATGTAAGAT
1620 GTGTGGAGGATGAACCTCAAAACGCACTCAAAAAGAGTAACCTTGGCGAACCAGTACATTGAAAAA

```

图 2 大口黑鲈 *LPLtype2* 基因 cDNA 及其编码氨基酸序列Fig. 2 The cDNA sequence and the deduced amino acid sequence of *LPLtype2* gene in *M. salmoides*

2.2 大口黑鲈 *LPLtype1* 和 *LPLtype2* 基因 cDNA 序列分析

将大口黑鲈 *LPLtype1* 和 *LPLtype2* 的氨基酸序列与其它物种 LPL 氨基酸序列进行同源性比较(图 3),结果表明:大口黑鲈 *LPLtype1* 与人、鸡、斑马鱼、鳊、点带石斑鱼、欧洲鲈、金头鲷、真鲷的 LPL 以及大麻哈鱼 *LPLtype1* 和大麻哈鱼 *LPLtype2* 的氨基酸同源性分别为 63%、64%、69%、94%、86%、93%、90%、91%、75%、45% (表 2)。大口黑鲈 *LPLtype2* 与人、鸡、斑马鱼、鳊、点

带石斑鱼、欧洲鲈、金头鲷、真鲷的 LPL 以及大麻哈鱼 *LPLtype1* 和大麻哈鱼 *LPLtype2* 的氨基酸同源性分别为 59%、59%、74%、53%、50%、53%、32%、33%、55%、82% (表 2)。大口黑鲈 *LPLtype1* 与 *LPLtype2* 之间的同源性为 43.5%。系统进化树(图 4)分析得到,大口黑鲈 *LPLtype1* 和同为鲈形目的肉食性鱼类鳊的 LPL 聚为一支,大口黑鲈 *LPLtype2* 和鲑形目的肉食性鱼类大麻哈鱼的 *LPLtype2* 紧密聚为一支。

表 2 大口黑鲈 *LPLtype1* 和 *LPLtype2* 氨基酸序列与其它物种的同源性比较Tab. 2 The identities of the deduced LPL amino acid sequences between *M. salmoides* *LPLtype1* and *LPLtype2* and other species

	大口黑鲈 <i>LPLtype1</i> <i>M. salmoides</i> <i>LPLtype1</i>	大口黑鲈 <i>LPLtype2</i> <i>M. salmoides</i> <i>LPLtype2</i>
人 LPL <i>Homo sapiens</i> LPL	63%	59%
鸡 LPL <i>Gallus gallus</i> LPL	64%	59%
斑马鱼 LPL <i>Danio rerio</i> LPL	69%	74%
鳊 LPL <i>Simiperca chuatsi</i> LPL	94%	53%
点带石斑鱼 LPL <i>Epinephelus coioides</i> LPL	86%	50%
欧洲鲈 LPL <i>Dicentrarchus labrax</i> LPL	93%	53%
金头鲷 LPL <i>Sparus aurata</i> LPL	90%	32%
真鲷 LPL <i>Pagrus major</i> LPL	91%	33%
大麻哈鱼 <i>LPLtype1</i> <i>Oncorhynchus clarkii</i> LPL type 1	75%	55%
大麻哈鱼 <i>LPLtype2</i> <i>Oncorhynchus clarkii</i> LPL type 2	45%	82%

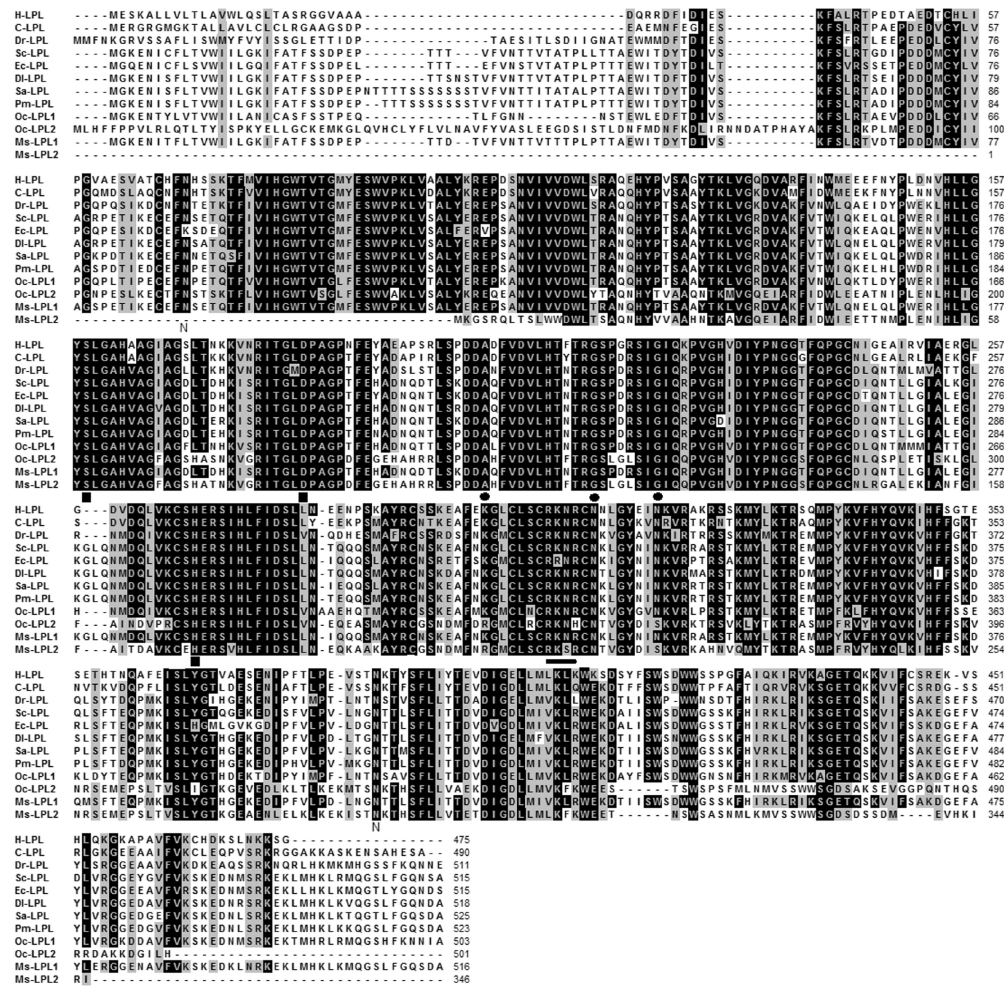


图3 大口黑鲈 LPLtype1 和 LPLtype2 与其他物种 LPL 的氨基酸序列比对照

人(H),鸡(C),斑马鱼(Dr),鳊(Sc),点带石斑鱼(Ec),欧洲鲈(Dl),金头鲷(Sa),真鲷(Pm),大麻哈鱼(Oc)。在序列中相同且同源性在80%以上的氨基酸残基用黑色背影表示,具有类似性质的氨基酸残基用灰色背影表示。活性位点(■),N-糖基化位点(N),二聚体形成的保守疏水残基位点(●),肝素结合域(—)。

Fig.3 Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of M. salmoides (Ms) LPL with the corresponding sequences from other species

Homo sapiens(H),Gallus gallus(C),Danio rerio(Dr),Siniperca chuatsi(Sc),Epinephelus coioides(Ec),Dicentrarchus labrax(Dl),Sparus aurata(Sa),Pagrus major(Pm),Oncorhynchus clarkii(Oc). Black shading with white letters shows more than 80% identical amino acid residues in sequences,as well as gray shading indicates amino acid residues with similar property. Active site residue(■),N-glycosylation site(N),conserved hydrophobic interaction site(●),heparin binding region(—).

对大口黑鲈 LPLtype1 和 LPLtype2 基因编码蛋白的功能域进行预测分析发现,脂蛋白脂肪酶活性中心位点在大口黑鲈 LPLtype1 (Ser179、Asp203、His291) 和 LPLtype2 (Ser60、Asp84、His169) 中均存在。脂蛋白脂肪酶形成二聚体发挥关键作用的氨基酸残基在大口黑鲈 LPLtype1 氨基酸序列中为 Ala223、Gly235 和

Gly242,在大口黑鲈 LPLtype2 氨基酸序列中为 Ala104、Gly116 和 Gly123。大口黑鲈 LPLtype1 非常保守的包含两个 N-糖基化位点(Asn90 和 Asn409),而大口黑鲈 LPLtype2 由于 N 端缺失,只含有一个糖基化位点(Asn288)。另外,在大口黑鲈 LPLtype1 和 LPLtype2 蛋白中均预测到有肝素结合域存在。

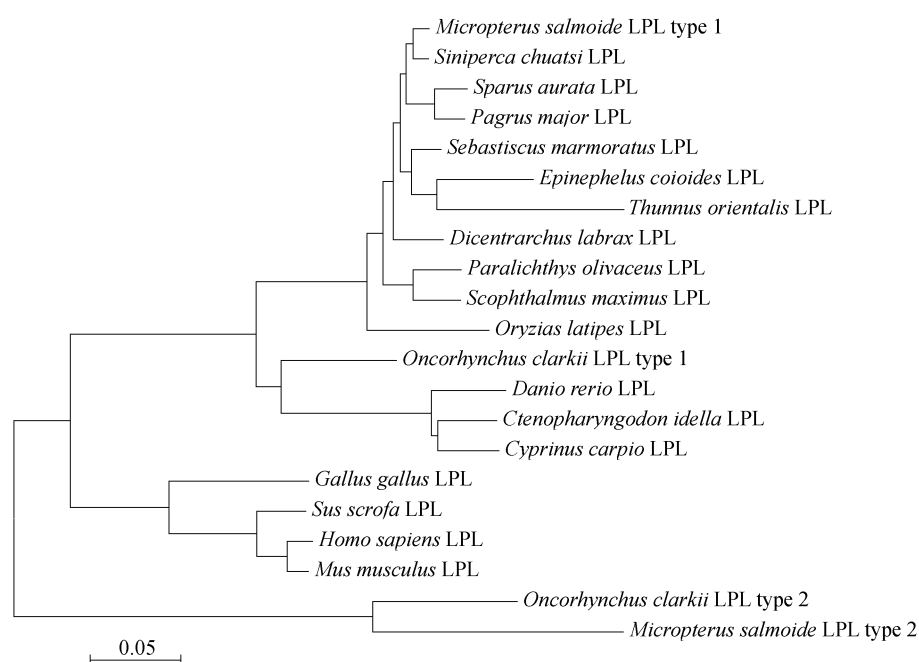


图4 大口黑鲈 LPL 系统进化分析

Fig. 4 The phylogenetic analysis of LPL in *M. salmoides*

2.3 大口黑鲈 LPLtype1 和 LPLtype2 mRNA 的组织分布

荧光定量 RT-PCR 分析结果表明,大口黑鲈 LPLtype1 和 LPLtype2 mRNA 在不同组织中的相对表达量相差很大。其中,大口黑鲈 LPLtype1 在肝脏中表达量最高,其次为胃、心、脾,在中肠中表达量最小(图 5);LPLtype2 在肝脏中的表达量也是最高,其次为幽门垂、中肠、胃、心,在垂体中的表达量最少(图 6)。

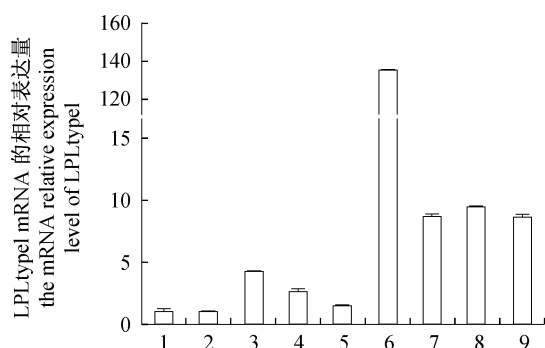


图5 大口黑鲈 LPLtype1 各组织的相对表达量

1. 前肠,2. 中肠,3. 后肠,4. 幽门垂,5. 垂体,6. 肝,7. 脾,8. 胃,9. 心。

Fig. 5 The relative expression level of LPLtype1 in *M. salmoides*

1. foregut,2. midgut,3. hindgut,4. pyloric caecum,5. pituitary,6. liver,7. spleen,8. stomach,9. heart.

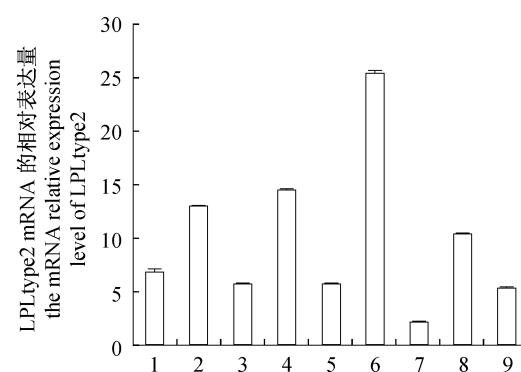


图6 大口黑鲈 LPLtype2 各组织的相对表达量

1. 前肠,2. 中肠,3. 后肠,4. 幽门垂,5. 垂体,6. 肝,7. 脾,8. 胃,9. 心。

Fig. 6 The relative expression level of LPLtype2 in *M. salmoides*

1. foregut,2. midgut,3. hindgut,4. pyloric caecum,5. pituitary,6. liver,7. spleen,8. stomach,9. heart.

3 讨论

3.1 大口黑鲈 LPLtype1 和 LPLtype2 基因结构及蛋白功能域的预测分析

实验通过 RT-PCR 和 RACE 的方法获得了大口黑鲈 LPLtype1 (2 156 bp) 和 LPLtype2 (1 710 bp) 基因 cDNA 全序列,其中 LPLtype1 编码 516 个氨基酸,LPLtype2 编码 346 个氨基酸。

经比对发现大口黑鲈 LPLtype2 氨基酸序列比 LPLtype1 少 119 个,主要表现为 N 端部分序列缺失。比对分析发现大口黑鲈 LPLtype1 和 LPLtype2 的主要功能域在硬骨鱼类和其它脊椎动物 LPL 间都比较保守。大口黑鲈 LPLtype2 N 端部分序列缺失,但主要功能域仍保留着,推测依然具有脂蛋白脂肪酶活性,可能是非功能域序列长期进化导致的结果。

氨基酸序列分析表明,大口黑鲈 LPLtype1 和其他物种 LPL 的同源性较高,LPLtype2 虽然也表现出一定的同源性,但同源性较低。大口黑鲈 LPLtype1 和 LPLtype2 的氨基酸同源性仅为 43.5%,在大马哈鱼中也发现了两个 LPL 基因,其氨基酸同源性也仅为 31%。鱼类中存在两个 LPL 基因可能是鱼类特有的第 3 轮全基因组复制的结果^[15]。类似的情况在其它物种中也存在,例如,罗非鱼(*Tilapia*)中存在两个生长激素促分泌素受体(*GHSR*)基因(*GHSR-1a* 和 *GHSR-1b*)^[16],两个胰蛋白酶(*TRY*)基因(*TRY I*^[17] 和 *TRY II*^[18]),草鱼中存在两种肌肉生长抑制激素(*MSTN*)基因(*MSTN-1* 和 *MSTN-2*)^[15],斑马鱼中存在两个肌肉生长抑制激素(*MSTN*)基因^[19],两种 *IGF-1* 基因和两种 *IGF-2* 基因^[20]。

二聚体形成位点、N-糖基化位点、活性中心位点、肝素结合域等是脂蛋白脂肪酶的主要功能域^[21]。脂蛋白脂肪酶以同源二聚体形式发挥功能,两个单体通过疏水作用相结合^[22]。在人类 LPL 氨基酸序列中,Ala203、Gly215 和 Gly222 对二聚体的形成十分重要,在人、鸡等内温脊椎动物 LPL 中高度保守^[21],这 3 个氨基酸残基在大口黑鲈 LPL 氨基酸序列中也高度保守。其中,在大口黑鲈 LPLtype1 氨基酸序列中为 Ala223、Gly235 和 Gly242,在大口黑鲈 LPLtype2 氨基酸序列中为 Ala104、Gly116 和 Gly123。

脂蛋白脂肪酶的 N-糖基化是 LPL 维持其催化活性的必要条件^[23-24]。据推测哺乳类动物有两个 N-糖基化位点(Asn-Xaa-Ser/Thr),在人 LPL 氨基酸的序列中为 Asn70 和 Asn386^[14],在这里 Xaa 可以是除了脯氨酸(Pro)之外的任何氨基酸^[25]。大口黑鲈 LPLtype1 也具有这两个 N-糖基化位点(Asn90 和 Asn409),而大口黑鲈 LPLtype2 由于 N 端缺失,只含有一个 N-糖基化位点(Asn288)。

鱼类、脊椎动物以及人类成熟 LPL 蛋白均存在活性中心位点,由 Ser159、Asp183 和 His268 共 3 个氨基酸残基(氨基酸残基位点编号为人的 LPL)形成催化中心三联体^[21,24,26],这 3 个氨基酸残基在大口黑鲈 LPLtype1 (Ser179、Asp203、His291) 和 LPLtype2 (Ser60、Asp84、His169) 中均存在。

组织器官中合成的 LPL 在肝素的作用下,通过其位于 C 端富含碱性氨基酸部分的肝素特异结合位点^[27],固定到组织器官内皮细胞表面的糖胺聚糖链上^[26]。人^[28]和鸟类^[29]被证实该区域对肝素结合位点的形成很重要,在大口黑鲈和其他物种 LPL 序列中也发现了潜在的肝素结合域。人 LPL 氨基酸序列 Arg306 ~ Arg309 共 4 个氨基酸残基中的 3 个碱性氨基酸残基(RKNR)^[21],在大口黑鲈 LPLtype1 (Arg329 ~ Arg332) 和大口黑鲈 LPLtype2 (Arg207 ~ Arg210) 均存在。

大口黑鲈 LPLtype1 和 LPLtype2 的二聚体形成位点、N-糖基化位点、活性中心位点、肝素结合域等主要功能域在硬骨鱼类和其他脊椎动物间都比较保守。尽管大口黑鲈 LPLtype1 和 LPLtype2 序列存在差异,推测它们具有相似的功能,可能在脂肪代谢的精密调节中分工不同。

3.2 大口黑鲈 LPLtype1 和 LPLtype2 在各组织的表达分析

脂蛋白脂肪酶(LPL)是由组织器官的实质细胞合成后分泌到胞外,同一种组织合成的 LPL 不会通过血液循环系统运送到机体的其他组织中发挥作用^[9,26],在一定程度上确保了用荧光定量技术检测各组织 LPL 表达量的准确性。LPL 是甘油三酯(triglyceride, TG)降解为甘油和游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)反应的限速酶,它的表达具有组织特异性^[7,30]。

实验运用实时定量 PCR 方法检测脂蛋白脂肪酶 mRNA 在前肠、中肠、后肠、幽门垂、垂体、肝、脾、胃、心中的表达量,发现大口黑鲈 LPLtype1 和 LPLtype2 在各组织均有表达,这与彭泽鲫中脂蛋白脂肪酶的组织表达情况是一致的^[31]。其中,大口黑鲈 LPLtype1 和 LPLtype2 均在肝脏中表达量最高,这可能由于鱼类缺乏皮下脂肪层,肝脏是其脂肪蓄积部位^[32]。LPL 在不同种属间组织表达分布不同,哺乳动物在其出生后肝脏 LPL 停止表达,在成人的肝脏中检测不

到 LPL 的表达^[33-34]。与哺乳动物形成对比的是,草鱼、金头鲷、虹鳟、真鲷的肝脏中都被发现了 LPL 基因的大量表达^[33]。人等哺乳类动物脂蛋白脂肪酶(LPL)、肝脂酶(hepatic lipase, HL)以及胰脂酶(pancreatic lipase, PL)具有高度相似的氨基酸序列,推测三者可能起源于同一个基因家族,具有相似的作用机制^[35],在高等脊椎动物肝脏中,脂质代谢可能由肝脂酶执行。大口黑鲈 LPLtype1 和 LPLtype2 在不同组织中表达的水平并不完全相同,这可能与长期进化使不同组织中脂蛋白脂肪酶在脂肪代谢中发挥的作用不同有关。

参考文献:

- [1] Krishnankutty N. Plant proteins in fish feed: An additional analysis [J]. *Current Science*, 2005, 89 (6):934-936.
- [2] 张强,杨帆. 鱼类抗脂肪肝因子研究进展[J]. *饲料广角*, 2012(6):42-49.
- [3] 王菊花,薛敏,丁建中,等. 鱼类营养性脂肪肝的研究进展[J]. *饲料工业*, 2008, 29(4):34-37.
- [4] 谭肖英,刘永坚,田丽霞,等. 鱼类对饲料脂肪源利用的研究进展[J]. *饲料广角*, 2007(5):38-41.
- [5] Albalat A, Sánchez-Gurmaches J, Gutiérrez J, et al. Regulation of lipoprotein lipase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 146 (3): 226-235.
- [6] Scanu A. Serum high-density lipoprotein: Effect of change in structure on activity of chicken adipose tissue lipase [J]. *Science*, 1966, 153 (3736): 640-641.
- [7] 谭正怀. 脂蛋白脂肪酶的组织特异性表达及其调节 [J]. *国外医学:内分泌学分册*, 2000, 20 (6): 320-324.
- [8] Eckel R H. Lipoprotein lipase: A multifunctional enzyme relevant to common metabolic disease [J]. *New England Journal of Medicine*, 1989, 320 (16): 1060-1068.
- [9] Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K. Lipoprotein lipase: Recent contributions from molecular biology [J]. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 1992, 29(3-4):243-268.
- [10] Wion K L, Kirchgessner T G, Lusic A J, et al. Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence [J]. *Science*, 1987, 235 (4796): 1638-1641.
- [11] Oku H, Ogata H Y, Liang X F. Organization of the lipoprotein lipase gene of red sea bream *Pagrus major* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 131(4):775-785.
- [12] Saera-Vila A, Calduch-Giner J A, Gomez-Requeni P, et al. Molecular characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) lipoprotein lipase: Transcriptional regulation by season and nutritional condition in skeletal muscle and fat storage tissues [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 142 (2):224-232.
- [13] Lindberg A, Olivecrona G. Lipoprotein lipase from Rainbow trout differs in several respects from the enzyme in mammals [J]. *Gene*, 2002, 292 (1-2): 213-223.
- [14] José-Ibáñez A, Peinado-Onsurbe J, Sánchez E, et al. Lipoprotein lipase (LPL) is highly expressed and active in the ovary of European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.), during gonadal development [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 150(3):347-354.
- [15] 濮剑威,孙成飞,蒋霞云,等. 草鱼两个肌肉生长抑制素 cDNA 克隆、表达及过量表达对胚胎发育的影响 [J]. *生物技术通报*, 2011, (8):153-166.
- [16] 高风英,王欢,叶星,等. 荷那龙罗非鱼两种 GHSR 基因的克隆与序列分析 [J]. *广东海洋大学学报*, 2011, 31(4):6-12.
- [17] 黎军胜,李建林,吴婷婷. 罗非鱼胰蛋白酶 I mRNA 克隆与分析 [J]. *水生生物学报*, 2006, 30 (2): 209-213.
- [18] 黎军胜,李建林,吴婷婷. 罗非鱼胰蛋白酶 II cDNA 克隆与序列分析 [J]. *南京农业大学学报*, 2005, 28 (1):139-142.
- [19] Biga P R, Roberts S B, Iliev D B, et al. The isolation, characterization, and expression of a novel GDF11 gene and a second myostatin form in zebrafish, (*Danio rerio*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 141(2):218-230.
- [20] 袁襄南. 草鱼重复基因 IGF-2 的克隆及其功能研究 [D]. 上海:上海海洋大学, 2010.
- [21] Raisonnier A, Etienne J, Arnault F, et al. Comparison of the cDNA and amino acid sequences of lipoprotein lipase in eight species [J]. *Comparative Biochemistry*

- and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 111(3):385-398.
- [22] 杜纪坤,黄青阳. 脂蛋白脂肪酶基因的研究进展[J]. 遗传, 2007, 29(1):8-16.
- [23] Zhang L Y, Lookene A, Wu G S, *et al.* Calcium triggers folding of lipoprotein lipase into active dimers [J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(52):42580-42591.
- [24] 周旋,姚翠鸾,王志勇. 鱼类脂蛋白脂肪酶的研究进展[J]. 海洋科学, 2009, 33(12):133-137.
- [25] Braut D, Noé L, Etienne J, *et al.* Sequence of rat lipoprotein lipase-encoding cDNA [J]. Gene, 1992, 121(2):237-246.
- [26] 梁旭方, Hiromi O K U, Hiroshi Y, 等. 海水鱼真鲷脂蛋白脂肪酶基因 cDNA 序列与组织表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(6):712-719.
- [27] 邢成锋,阎萍,梁春年,等. 脂蛋白脂肪酶基因的研究进展[J]. 华北农学报, 2008, 23(S2):84-87.
- [28] Hata A, Ridinger D N, Sutherland S, *et al.* Binding of lipoprotein lipase to heparin. identification of five critical residues in two distinct segments of the amino-terminal domain [J]. Biological Chemistry, 1993, 268(12):8447-8457.
- [29] Berryman D E, Bensadoun A. Site-directed mutagenesis of a putative heparin binding domain of avian lipoprotein lipase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(5):3272-3276.
- [30] Ong J M, Simsolo R B, Saghizadeh M, *et al.* Effects of exercise training and feeding on lipoprotein lipase gene expression in adipose tissue, heart, and skeletal muscle of the rat [J]. Metabolism, 1995, 44(12):1596-1605.
- [31] 程汉良,王鑫,彭永兴,等. 彭泽鲫 LPL 基因全长 cDNA 克隆及组织表达研究[R]. 昆明:2008 年中国水产学会学术年会, 2008.
- [32] 梁旭方,白俊杰,劳海华,等. 真鲷脂蛋白脂肪酶基因表达与内脏脂肪蓄积营养调控定量研究[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(6):625-631.
- [33] Cheng H L, Meng X P, Sun S P, *et al.* Cloning and expression analysis of a cDNA encoding lipoprotein lipase from the liver of adult grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Aquaculture Research, 2009, 40(16):1838-1848.
- [34] 周冰,曾武威,孙国涛,等. 树鼯脂蛋白脂肪酶的 cDNA 克隆组织分布及活性测定[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(11):801-804.
- [35] 张振波. 猪脂蛋白脂肪酶(LPL)和激素敏感脂肪酶(HSL)基因的序列和多态性分析及体外表达的研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2006.

Cloning and expression analysis of two cDNAs encoding lipoprotein lipase of *Micropterus salmoides*

ZHU Zemin^{1,2}, MA Dongmei², BAI Junjie^{2*}, LIANG Xufang¹

(1. Department of Bioengineering, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: To promote the theoretical basic research on developing artificial feed for carnivorous fishes, and the analysis of fat metabolizing mechanism in fish, the cDNA of LPLtype1 and LPLtype2 genes from largemouth bass (*Micropterus salmoides*) are cloned. The sequence analysis indicates that LPLtype1 cDNA is 2 156 bp in length, encoding 516 amino acids; and LPLtype2 cDNA is 1 710 bp in length, encoding 346 amino acids. The amino acid sequence of LPLtype1 is 43.5% identified to that of LPLtype2. Phylogenetic analysis indicates that LPLtype1 of *M. salmoides* and LPL of *Siniperca chuatsi* gather to one branch. LPLtype2 of *M. salmoides* and LPLtype2 of *Oncorhynchus clarkii* gather to the other branch. The predictive analysis of the protein encoded by LPLtype1 and LPLtype2 genes in *M. salmoides* shows that the main functional regions are conservative compared with the bony fishes and other vertebrates, such as active site residue, N-glycosylation site, conserved hydrophobic interaction site, heparin binding region. The tissue expression levels of LPL mRNA are detected by real time PCR, and the results show that expression levels of LPLtype1 and LPLtype2 are the highest in liver, which suggests that fish liver plays an essential role in storing lipids induced by nutrition.

Key words: *Micropterus salmoides*; lipoprotein lipase; tissue expression; liver injury

Corresponding author: BAI Junjie. E-mail: jjbai@163.net