

文章编号:1000-0615(2009)06-0912-13

鳊 UCPI,2 基因结构、序列分析及组织表达

王琳¹, 梁旭方¹, 李光照¹, 刘秀霞¹, 林群¹, 白俊杰²

(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, 广东 广州 510380)

摘要:从分子水平上探讨了鳊解偶联蛋白 1、2 (UCPI, 2) 基因结构、组织表达水平及与产热、脂肪代谢等生理机能的关系。通过与脊椎动物 UCPI、UCP2 基因序列进行比对, 设计简并引物与特异引物进行 PCR 和 RACE 扩增、测序、拼接序列, 获得 UCPI、UCP2 的基因组序列和内含子/外显子结构。基因组步行法克隆鳊肝脏 UCPI、UCP2 基因 5'侧翼序列。应用半定量 RT-PCR 的方法, 以 β -肌动蛋白作为外参照, 在其指数期增长的范围内得到鳊不同组织 UCPI、UCP2 的相对表达水平。结果表明, UCPI 基因组全序列为 3 146 bp, 5'侧翼调控区为 1 333 bp, 含有 5 个内含子和 6 个外显子, 开放阅读框(ORF)长 942 bp, 编码一个大小为 313 个氨基酸的蛋白质。UCP2 基因组全序列为 2 890 bp, 5'侧翼调控区为 1 800 bp, 含有 7 个内含子和 8 个外显子, ORF 长 939 bp, 编码一个大小为 312 个氨基酸的蛋白质。UCPI、UCP2 间隔外显子的内含子皆符合“GT-AG”规则, 内含子的数目与哺乳动物一致。系统进化分析表明, 鳊 UCPI、UCP2 氨基酸序列分别与鱼类 UCPI、UCP2 氨基酸序列聚为一支, 且与 UCP3、UCP4、UCP5 分支区分明显。鳊 UCPI、UCP2 基因不同组织表达水平的高低可能与鳊本身的生态习性及各器官在产热、脂质代谢中的作用相关, 但明确的分子机制尚待进一步研究。

关键词:鳊; 解偶联蛋白; 基因克隆; 序列分析; 组织表达

中图分类号:Q 786; S 917

文献标识码:A

通过生理性解偶联调节氧化磷酸化效率, 兼顾 ATP 的有效合成与抑制呼吸链活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的过量生成, 可能是进化早期发展起来对生命存在至关重要的一种普遍策略, 其分子机理是目前国内外研究的热点^[1]。到目前为止, 比较基因组学、系统发生及基因表达分析方法研究结果表明, 除解偶联蛋白 5 (UCP5) 之外的所有 UCPI ~ 4 均存在于变温硬骨鱼类中。这一发现否定了 UCPI 在有胎盘哺乳动物中的单一起源性质, 表明 UCP 家族至少 4 个成员在大约 4.2 亿年前辐鳍脊椎动物和叶鳍脊椎动物支系分支前就已经存在^[2]。其中, 哺乳动物褐色脂肪组织的 UCPI, 介导呼吸链产生的质子梯度泄漏, 使氧化产生的能量以热的形式散发。在鲤中, UCPI 基因主要在肝脏中表达, 暴露于冷

环境则表达量急剧减少, 这与哺乳动物 UCPI 的表达调控正好相反。此外, 鲤 UCPI 基因也被发现在脑中表达, 冷诱导后表达量提高 2 倍, 线粒体质子泄漏特征与哺乳动物相似, 但鱼类等变温动物 UCPI 的生理意义尚需进一步研究确立^[2]。UCP2 在哺乳动物组织中广泛表达, 在产热、控制活性氧生成、脂肪酸氧化以及肥胖、糖尿病的发生中均发挥重要作用, 转录调节较复杂。与 UCPI 相比, UCP2 的解偶联作用较温和, 具有微弱的产热作用, 其在南极鱼 (*Pachycara brachycephalum*) 抵抗极端环境低温胁迫过程中可能发挥关键作用^[3]。然而, UCP2 基因在斑马鱼 (*Zebra rerio*) 和鲤 (*Cyprinus carpio*) 等热带、温带鱼类普遍存在并高水平表达, 说明 UCP2 可能还具有除了生热作用以外的其它生理功能, 然而其真正的生理功能

收稿日期:2008-12-03

修回日期:2009-05-14

资助项目:广东省海洋渔业科技推广专项项目 (A200899D02); 广东省自然科学基金项目 (031886, 980702)

通讯作者:梁旭方, Tel: 020-85221497, E-mail: tianxf@jnu.edu.cn

尚不确定^[4-5]。本研究首次成功克隆了鳊 UCP1、UCP2 基因全序列和内含子/外显子结构,进行了序列同源性、系统进化分析及不同组织表达水平的研究,将为鱼类生理机制的探索提供重要理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

鳊 5 尾(全长 15~17 cm)取自广州南海鳊养殖池塘。

1.2 方法

总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成 鳊捕获后立即分离其肝脏、肠道、脾脏、脂肪、肌肉和大脑组织,总 RNA 的提取与纯化按 Promega 公司的 SV Total RNA Isolation System 试剂盒推荐方法进行。cDNA 第一链的合成使用 ReverTra Ace- α -TM (TOYOBO) 试剂盒,以鳊肝脏总 RNA 为模板,oligo(dT)₁₈ 为反转录引物,按试剂盒推荐方法进行。

鳊肝脏 UCP1、UCP2 基因 cDNA 核心序列的克隆 根据人、大鼠、小鼠、鲈形目和鲤形目真骨鱼类等已知脊椎动物 UCP1、UCP2 基因氨基酸序列的保守区域设计 2 对简并引物,UCP101F 和 UCP102R,UCP201F 和 UCP202R (表 1)。以肝脏 cDNA 为模板进行 PCR,扩增条件为 94 °C 预变性 3 min,94 °C 1 min,40 °C 1 min,72 °C 1 min,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。

鳊肝脏 UCP1、UCP2 基因 cDNA 5'端、3'端的扩增 根据克隆得到的鳊 UCP1 cDNA 核心片段及试剂盒要求分别设计 5'-RACE 反转录引物 UCP1RT 和特异引物 UCPIA1、UCPIA2 和 UCPIA2。5'-RACE 的操作按 5'-Full RACE Core Set 试剂盒 (TaKaRa) 推荐方法进行。取 5 μ L 总 RNA (约 5 μ g),以 UCP1 RT 为引物合成 cDNA 第一链后,加入 RNase H,分解 mRNA,接着用 T₄ 连接酶对单链 cDNA 进行环化。cDNA 环化产物用 TE Buffer 稀释 10 倍备用。首次 PCR 反应体系为 4 μ L 10 倍稀释产物,5 μ L 10 \times Taq Buffer,4 μ L dNTP (2.5 mmol/L each),r Taq 酶 0.25 μ L,以及 UCPIA1、UCPIA2 引物各 1 μ L,加 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 3 min,随之 94 °C 1 min,55 °C 1 min,72 °C 1 min,25 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。取首次扩

增产物 1 μ L,用 UCPIA2、UCPIA2 引物进行二次 PCR 扩增,扩增条件为 94 °C 预变性 3 min,94 °C 1 min,60 °C 1 min,72 °C 1 min,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。

根据克隆得到的鳊 UCP2 cDNA 核心片段及试剂盒要求分别设计 5'-RACE 特异引物 UCP2 5'01R 和 UCP2 5'02R。5'-RACE 的操作按 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech, USA) 推荐方法进行。取 1 μ L 总 RNA (约 1 μ g),以试剂盒提供的 5'-RACE CDS Primer A,SMART II TM A Oligonucleotide 为引物,合成 cDNA 第一链后,用 TE Buffer 稀释 10 倍备用。首次 PCR 反应体系为 10 倍稀释产物 2.5 μ L,10 \times PCR Buffer 5 μ L,dNTP (10 mmol/L each) 1 μ L,PowerScript Reverse Transcriptase 1 μ L,以 UCP2 5'01R 引物 1 μ L、试剂盒提供的 10 \times Universal Primer A Mix (UPM) 引物 5 μ L,加 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 3 min,随之 94 °C 1 min,62 °C 1 min,72 °C 1 min,25 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。取首次扩增产物 1 μ L,用试剂盒提供的 Nested Universal Primer (NUP) 引物、以 UCP2 5'02R 引物进行二次 PCR 扩增,扩增条件为 94 °C 预变性 3 min,94 °C 1 min,57 °C 1 min,72 °C 1 min,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。

分别根据克隆得到的鳊 UCP1、UCP2 cDNA 核心片段及 3'-Full RACE Core Set (TaKaRa) 试剂盒要求设计 2 对 3'-RACE 上游引物 UCPIP1 和 UCPIP2、UCP2P1 和 UCP2P2 下游引物用试剂盒提供的引物。3'-RACE 的操作参照试剂盒推荐方法。首先以试剂盒提供的 oligo dT-3 sites Adaptor primer 为引物进行反转录反应。然后以试剂盒提供的引物 3 sites Adaptor primer 分别与 UCPIP1、UCP2P1 进行首次 PCR 反应,反应条件为 94 °C 预变性 3 min,94 °C 1 min,55 °C 1 min,72 °C 1 min,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min;巢式 PCR 所用引物为 3 sites Adaptor primer 与 UCP2P2 或 UCPIP2,PCR 反应条件与 5'-RACE 二次 PCR 相同。

基因组步行法克隆鳊肝脏 UCP1、UCP2 基因 5'侧翼序列 鳊血液总 DNA 的提取采用 QIAGEN Blood & Cell Culture DNA kit (QIAGEN),按试剂盒推荐的方法进行操作。基因组步行法采用 BD GenomeWalkerTM Universal Kit (Clontech),

表1 鳊UCP1、UCP2与 β -ACT基因PCR引物序列

Tab.1 Primer sequences for PCR of Chinese perch UCP1, UCP2 and ACT gene

引物名称 name of primer	引物序列 sequence of primer
核心序列 partial cDNA sequence	
UCP101F	5'-TCACCTTTCACACTGGACACCGCA (C/T) AAG (A) GT-3'
UCP102R	5'-ATAGGTGACAAACATA (C) ACC (T) ACA (G) TTCCA-3'
UCP201F	5'-TTCCACTGGACACCGCAAA (G) GT -3'
UCP202R	5'-GTGACAAACATAACCACA (G) TTCCA -3'
5'RACE	
UCP1RT	5'- (P) CTTGATCAGGTCGTA-3'
UCP1S1	5'-TCTGTAACGGATGCCTTC-3'
UCP1A1	5'-AGGCACACTACCCAACATCAC-3'
UCP1S2	5'-GCAGTCTTCTCTCCCTGAAT-3'
UCP1A2	5'-GCTAGTCAACTGCACAGAGC-3'
UCP2 5'01R	5'-CGATACCAACATGATCAGAGC -3'
UCP2 5'02R	5'-GAGACCAATGCGGACAGAG -3'
3'RACE	
UCP1P1	5'-CTAGATACATGAACTCACC-3'
UCP1P2	5'-CAGTACAAGAGCGCTATCA-3'
UCP2P1	5'-CTTGGCCAGTACAGCAGTGTG -3'
UCP2P2	5'-GTGCTGCTGCCATGATGAG -3'
5'侧翼区 5'flanking	
UCP1GSP1	5'-CCATTGAAGTAATGCAACAC-3'
UCP1GSP2	5'-GTGCAGCAGACAGTGTGTG-3'
UCP1GSP3	5'- GCCTTTATAGTCAAACCTCACACCAG-3'
UCP1GSP4	5'- CAGATACTCTTCACACTT-3'
UCP2GSP1/ DUCP204R	5'-GCCTCTCCAAGTGACCCTATG- 3'
UCP2GSP2	5'-AGTGAATGGTCAGGAATCC- 3'
内含子 introns	
UCP1I0F	5'-CTGCATAGCTGACATTGTCAC- 3'
UCP1I10R	5'-TGTCATAGAGCCGATTCTGA- 3'
UCP1I20F	5'-TCAGAATCGGCTCTATGACA- 3'
UCP1I20R	5'-CCATTCAGGTTTCATCTGG- 3'
UCP1I30F	5'-CCATTCAGGTTTCATCTGG- 3'
UCP1I30R	5'-GGAAGCAATCACCGTGGTA- 3'
UCP1I50F	5'-TACCACGGTGATTGCTTCC- 3'
UCP1I50R	5'- AACATCACAACATTCCACG- 3'
UCP2I10F	5'-GGTCACTTGGAGAGGCAT- 3'
UCP2I10R	5'-CAGGTGGCTTATTAATGTGG- 3'
UCP2I30F	5'-TCGCTGACCTGCTCACCTT- 3'
UCP2I30R	5'-GAGACCAATGCGGACAGAG- 3'
UCP2I40F	5'-CTCTGTCCGATTGGTCTC- 3'
UCP2I40R	5'-CATCACCACGTTCCAGGAG- 3'
基因表达 expression level	
DUCP103F	5'-CATCCGTTACAGAGGG-3'
DUCP104R	5'-GATACAAAGTGGCAAGGC-3'
DUCP203F	5'-CCATTCAGGTTTCATCTGG- 3'
DUCP204R	5'-GCCTCTCCAAGTGACCCTATG- 3'
DACT01F	5'-CGTGACATCAAGGAGAAGC-3'
DACT02R	5'-TCTGCTGGAAGGTGGACAG-3'

实验操作按试剂盒推荐方法进行。制备的基因组 DNA (2.5 μg) 经 *Dra* I 限制性内切酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切过夜后,用等体积的苯酚抽提一次,氯仿抽提一次,加入二倍体积的无水乙醇和 1/10 体积 3 mol/L 的 NaAc 溶液,混匀,14 000 r/min 离心 10 min。沉淀用 80% 乙醇洗涤一次,14 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀空气干燥后,溶于 20 μL TE (10/0.1, pH 7.5),取 4 μL 用于连接反应。连接反应体系组分为 10 \times 连接反应缓冲液 1.6 μL ,酶切纯化后的基因组 DNA 4 μL ,连接头(25 $\mu\text{mol/L}$) 1.9 μL , T_4 连接酶 0.5 μL ,总体积为 8 μL ,16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜;70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 终止反应,加入 72 μL TE (10/1, pH 7.5) 将连接反应液稀释 10 倍。

取 1 μL 连接反应液进行首轮 PCR 反应,反应体系为 10 \times PCR 缓冲液 5 μL , dNTP (2.5 mmol/L each) 4 μL , 接头引物 AP1 各 1 μL , 基因特异引物 UCPIGSP1、UCP2GSP1 1 μL , 连接反应液 1 μL , LA *Taq* 酶 (Takara) 0.5 μL , 加 ddH₂O 至 50 μL ; 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。将首次 PCR 产物稀释 50 倍, 取 1 μL 稀释液作为模板进行二次 PCR。PCR 反应体系为 10 \times PCR 缓冲液 5 μL , dNTP (2.5 mmol/L each) 4 μL , 接头引物 AP2 各 1 μL , 基因特异引物 UCPIGSP2、UCP2GSP2 1 μL , 首次 PCR 产物稀释液 1 μL , LA *Taq* 酶 0.5 μL , 加 ddH₂O 至 50 μL ; 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

将 UCPI 5'侧翼序列得到的 PCR 条带回收、克隆、测序后,再设计 2 条引物 UCPIGSP3 和 UCPIGSP4,以同样方法获得约 700 bp 的 PCR 条带。

鳊肝脏 UCPI、UCP2 基因内含子序列的扩增

根据克隆得到的鳊 UCPI、UCP2 cDNA 全序列与人、大鼠、小鼠和斑马鱼等已知基因结构的脊椎动物 UCPI、UCP2 基因相比较推测其内含子位置,分别设计特异引物 UCPII10F 和 UCPII10R (扩增内含子 1)、UCPII20F 和 UCPII20R (扩增内含子 2)、UCPII30F 和 UCPII30R (扩增内含子 3、4)、UCPII50F 和 UCPII50R (扩增内含子 5); UCP2I10F 和 UCP2I10R (扩增内含子 1、2)、UCP2I30F 和 UCP2I30R (扩增内含子 3)、

UCP2I40F 和 UCP2I40R (扩增内含子 4~7)。以鳊基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应条件与 5'RACE 二次 PCR 相同。

PCR 产物的克隆、序列分析及系统树构建

PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳纯化, H. Q. & Q. Gel Extraction Kit II (U-gene) 回收后克隆至 pMD 18-T 载体 (TaKaRa), 转化感受态 *E. coli* JM109, 利用 M13 正反向引物, 通过 PCR 筛选阳性克隆, 阳性克隆菌液由上海英骏生物技术公司 ABI 3730 测序仪进行测序。根据测序结果进行分析整理得到鳊 UCPI、UCP2 cDNA 全序列, 推测得到其氨基酸序列, 与 GenBank 上发表的多种脊椎动物 UCPs 氨基酸序列, 用 BLAST 和 DNA 分析软件 Vector NTI suite 6.0 进行序列同源性分析。用 Mega 3.1 软件采用邻接法构建系统树, 1000 次重复计算靴带 (bootstrap) 值。

鳊不同组织 UCPI、UCP2 mRNA 表达水平的测定 用半定量 RT-PCR 方法比较鳊 ($n=5$) 肝脏、肠道、脾脏、脂肪、肌肉和大脑 UCPI、UCP2 mRNA 的组织表达水平, 以 β -肌动蛋白为外参照。cDNA 合成第一链, 设计鳊 UCPI、UCP2 与 ACT (GenBank: AY885683) 基因特异引物 DUCPI103F 与 DUCPI104R、DUCP203F 与 DUCP204R、DACT01F, 与 DACT02R 分别扩增 495、279、436 bp cDNA 片段。

PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 然后进行 30 个循环反应, 其温度循环条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 min, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 min; 循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 5 min。指数增长期内终止反应。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色后用凝胶成像系统及相关软件进行分析 (AlphalmagerTM, Alpha innotech, USA), 结果分别以 UCPI、UCP2 与 β -肌动蛋白 mRNA 的 RT-PCR 产物亮度之比 (%) 表示。

统计分析 应用统计分析软件 SPSS 10.0 对鳊不同组织 UCPI、UCP2 相对表达水平平均值差异进行统计分析。所有结果以平均数 \pm 标准误差表示, 进行单因素方差分析, 组间比较采用 LSD 方法, 显著性差异表示为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 鳊 UCPI 基因组全序列的克隆与分析

以鳊肝脏 cDNA 为模板, 简并引物进行 PCR

扩增,得到大小约为 800 bp 的 PCR 产物。将产物电泳纯化、回收后克隆至 pMD 18-T Vector。用 M13 正反向引物进行测序,得到片段大小为 774 bp,编码 258 个氨基酸的序列。将测序得到的序列在 NCBI 网站上 BLAST 确认。5'RACE 和 3'RACE 技术分别从鳊肝脏获得 2 个预期片段大小的 PCR 产物,对这 2 个片段进行克隆、测序,分别得到 713、705 bp 的 cDNA 片段。通过序列拼接,确定鳊 UCP1 基因 cDNA 全长 1 519 bp。序列分析表明,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA, polyA 加尾信号为 AATAAA。开放阅读框(ORF)长 942 bp,编码 313 个氨基酸。5'-端非翻译区(5'-UTR)长 116 bp,3'-端非翻译区(3'-UTR)长 461 bp(图 1)。

根据克隆得到的鳊 UCP1 cDNA 全序列与其它基因结构已知的人、大鼠、小鼠等脊椎动物 UCP1 基因相比较推测其内含子位置,分别设计特异引物,以鳊基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。UCP1 长 3 146 bp 含有 5 个内含子和 6 个外显子,间隔外显子的 6 个内含子符合“GT-AG”规则,UCP1 内含子 1~5 大小分别为 323、734、93、329、148 bp,鱼类 UCP1 基因内含子长度比哺乳类短(图 2)。UCP1 基因结构在小鼠、大鼠、人和鱼中高度保守(图 1)。

应用 Genome Walker 技术,采用 UCP1GSP1 和 UCP1GSP2 经过两轮 PCR 扩增,从 *Dra* I 基因组文库中扩增得到约 800 bp 的 PCR 条带,将该条带回收、克隆、测序后得到 771 bp 的 DNA 片段。以 UCP1GSP3 和 UCP1GSP4 以同样方法获得约 700 bp 的 PCR 条带,将该条带回收、克隆、测序后得到 702 bp 的 DNA 片段。通过序列拼接,确定鳊 UCP1 基因 5'侧翼区长 1 333 bp。对鳊 UCP1 基因 5'侧翼序列进行分析发现,在起始密码子 ATG 上游 -141 bp 处有一个典型的 TATAA 框,在 ATG 上游 -633 bp 处有一个典型的 CAAT 框,未发现典型的 GC 盒(图 1)。软件分析发现 UCP1 基因的转录起始位点有多个可调节其表达的调控元件,如 SP1、AP1、AP2、CCAAT-增强子结合蛋白(CEBP)、环磷酸腺苷应答元件结合蛋白(CREB)、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)和 MyoD 的作用位点等。在 ATG 上游 -264 bp、-1141 bp 处还发现两个芳香烃受体核转位因子(ARNT)与芳香烃受体(AHR)的异

源二聚体以及 ARNT 同源二聚体的结合位点。

2.2 鳊 UCP2 基因组全序列的克隆与分析

以鳊肝脏 cDNA 为模板,简并引物进行 PCR 扩增,得到大小约为 620 bp 的 PCR 产物。将产物电泳纯化、回收后克隆至 pMD 18-T Vector。用 M13 正反向引物进行测序,得到片段大小为 626 bp,编码 208 个氨基酸。将测序得到的序列在 NCBI 网站上 BLAST 确认。5'RACE 和 3'RACE 技术分别从鳊肝脏获得 2 个预期片段大小的 PCR 产物。对这 2 个片段进行克隆、测序,分别得到 640、775 bp 的 cDNA 片段。通过序列拼接,确定鳊 UCP2 基因 cDNA 全长 1892 bp。序列分析表明,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA, polyA 加尾信号为 AATAAA。ORF 长 939 bp,编码 312 个氨基酸。5'-UTR 长 342 bp,3'-UTR 长 225 bp(图 3)。

根据克隆得到的鳊 UCP2 cDNA 全序列与人、大鼠、小鼠和斑马鱼等已知基因结构的脊椎动物 UCP2 基因相比较推测其内含子位置,分别设计特异引物,以鳊基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。结果表明,UCP2 基因组全序列长 2 890 bp,含有 7 个内含子和 8 个外显子,有 6 个外显子有编码功能,间隔外显子的 7 个内含子皆符合“GT-AG”规则,UCP2 内含子 1~7 大小分别为 89、294、230、95、95、92、106 bp(图 3)。虽然鱼类 UCP2 基因结构与人、小鼠的非常相似,各外显子长度也几乎一样,但鱼类 UCP2 基因内含子长度比哺乳类短^[5],UCP2 基因结构在小鼠、大鼠、人和鱼中也高度保守(图 2)。

应用 Genome Walker 技术,采用 UCP2GSP1 和 UCP2GSP2 经过两轮 PCR 扩增,从 *Dra* I 基因组文库中扩增得到约 1 800 bp 的 PCR 条带,将该条带回收、克隆、测序后确定鳊 UCP2 基因 5'侧翼区长 1 800 bp。对鳊 UCP2 基因 5'侧翼序列进行分析发现,在起始密码子 ATG 上游 -436 bp 处有一个典型的 TATA 框,在 ATG 上游 -669 bp 处有一个典型的 CAAT 框,未发现典型的 GC 盒(图 2)。软件分析发现 UCP2 基因的转录起始位点有多个可调节其表达的调控元件,如 HNF3、CDXA、API、GATA、MZF1、USF、XFD1、SRY、CEBP 与 CREB 的作用位点等。在 ATG 上游 -683 bp 和 -705 bp 处还发现一个亲电子反应元件(EpRE)位点和一个糖皮质激素反应元件(GRE)位点。

1333 caccaggatacagfaaaatattgcttatactcctctgggtccaccaggctcgtctaaacaatatggctcttcgagttttgatttetaata 1244
 CEBP
 -1243 tttttatagattacatctttggggagagcattatgacactaacatttatgggaaataagaagctfgagccttttggtttagcttctgtttt -1154
 SPI
 -1153 tttttatgattatacactcaagtggcaattttataggtacacctagctaaaactaatacagcttaataacaacagctcctgctataaaatcc -1064
 -1063 ttcattcatgaaggtataatgttcagtttttggcaactgttttagagaggtgttgattcaacatttaaaactgtacttttagggct -971
 AHR/ARNT API
 -973 gtccaactgtatfaaaaaaattgaaacacctctcaatataacgcattaaaactcaaaagtacaaaaaactacatcctccacaatgacca -884
 CEBP
 -883 ttaatttcocatactgtttgagaagctacataggttagattatcaaggattattgaacagacaccatcactgccaaactgtgaaacag -794
 CEBP PPAR
 -793 gttgacgcaaaagttctttatctgctccacagtgaaactcagctactgtttacgtcactactcctcccgaigtcttttttaaaaaaggtt -704
 CREB CREBP AP2
 703 ggtgacactctttotcaaaagtgtgaagagtatctgttaataagaatcataacaacaggtataatattgttaataatgcaaacaaa 614
 API
 -613 tggcaaaatcctgctgatacaatcaacgctactcaaaagtgaaagggcaacctggggggagglllgactataaaaggtctctgcaatlla -524
 API
 -523 gccaactcagctccaaacactttctgtttgtcaacaacactgtctgtcattggctgagagcaaaagacagcctcccaataaacctctt -434
 CAAT SPI
 -433 taittagctttattatgactgtttgtaagtcagacacatggtcctaagtaaaataatfacttaataatgaactcagtcacagacag -344
 CREB CFBP
 -343 gacagaaagaaatcctgcaagaaatcctgaatgtaacatagatgtagtggllgallatallgaaaggaagaaatgacatllagacata -254
 CEBP
 -253 ttaataatagtttatagacagaatataacacaatttggatgaaaagatactgcagctcactgaataggcaagttaaatagttgtttttct -164
 CEBP
 -163 gaaatgctccctgcacctgggggaaatgaaacatgacatllctgacagctcagtggaatllgctllgacccatgctacaggaglacacag -74
 AHR/ARNT CREB CEBP
 73 taacgctctctgtagatgccataaaaaagccaccagaagacatataagttacagacagcacaatagatctctttCTTTCTGTAGAGTGGG 17
 TATA
 18 GCCTTTTATGGGTTATAATCTGGCAATCAATCCTGCCTGGTAACAACAACCTGAGGATCAAAGGAACATTTAAATTTAGACAATTA 107
 108 TTAGAAAACATGGTGGGACTTAAACCCCTAGATGTTCCCTCCACTGGGGTGAAGATGGCAAGTCTGGGGCAGCAGCCCTGCATAGCT 197
 198 GACATTGTCACATTTCTCTGGACACAGCTAAAGTCAGACTACAGtatectgttcagttatctgacaagaagaagaatctctgtt 287
 289 calctcctccagtaacataaacatallctctccatcttacgcaatgcaletgualatlatgtlglgalaatglettcagctgctel 377
 378 aattttggaactttggaacacagtgatgtttggcaaccattgactgagcagctgacttcaactttgtacactcattgtccctcact 467
 468 actctctgctgctgcaactgcaacttttagtotaatattttctacttttagttctgtaaaagctggttotaagccttgagtaaacctgt 557
 558 aaccaccagATTACCGGAGACAAGACTGCAGTGAAGCCATCCCTTACAGAGCCCTGTTTGGACCATCAGCCACATCATCCGACAGAGG 647
 648 GGCCCAAGTCTGTGACAAAGGGCTGGTAGCAGGGCTGCAGAGACAAGTGTCTCGCTCCATCAGAAATGGGCTCTATGCAATGTCA 737
 738 AAGATTTACACTGGTGGCAAGGACAgtaagtggttactctggaagtacaaggtttcttttgaattacatattttcagcttcaac 827
 828 aataaagtaaalalaggtgtaalaagagttcagcaagtaagaalctgagggcagtgacacaaatgagttlllaalggagaatl 917
 918 lalagagcccaaaalcaaaaallgctcagaggtclllacaalcaaacatgacacagctgctgctcllagacccllegalteagat 1007
 1008 aagcagggggggggggctggaagagagcaactgcccaggggaccccttatccaggactgacagatgtgcaaacagctgctgtatgtaacata 1097
 1098 lagacagaaglcacagcagtagaalclcaatallggatatacaaacacaaaglaaalaaglacacaaalacalagclctctatgla 1187
 1188 aatggatgtaaaatgactgagttatatacctctctctccagACCCCTGGTGTACTGGTACGTATCCTGGCTGGCTGACTACAGGTGGCAAT 1277
 1278 aagatggcttttttagttttgctgatagcaggtgttaaaatataatataatataatataatataatataatataatataatataatataat 1367
 1368 gagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagag 1457
 1458 taattgagtaaaatgactgagttatatacctctctctccagACCCCTGGTGTACTGGTACGTATCCTGGCTGGCTGACTACAGGTGGCAAT 1547
 1548 GGCAGTCTCTTTGCACAACCTACTGATGTGGTCAAGGTCGATTCGAAGCCAGATGAACCTGAATGGTGTGGCTCGTGTACAGTGG 1637
 1638 CACTCTGCAGGCCATAAACAACATCTCCAGATGAGGGGCATTCGTGGACTCTGGAAAGlgccallltaggaagcagcclcaaaaaalaa 1727
 1728 gttactcttttggctcagaatgattggataagttattattcttttgggttctcagGCACACTACCAACATCACAAGAAAGCC 1817
 1818 GCTAGTCAACTGCACAGAGCTGCTCAGATACAGCTGATCAAGGAGGCCATCCTTAGACACAACCTGATGTCAGgtgagtggaagagctc 1907
 1908 atgctgtgtgtctgtgctacagtaaacacacacacacagctgattggactgaaatctacacaacctctcaccctttcaactcaceaa 1997
 1998 cagctgataaacagcacaacatgctggtagaacaatagtgatllctctccacagtgclgaaatcacagtagltaaatgacattatct 2087
 2088 ccatcatttatgtgtctccattcaaaaggttgcaataatctgctgatagctatactgctcagcaaaaaggccctctggtgctct 2177
 2178 catctacgctctttagttgtttgtttccatctctctccacagACAATCTGCCTTGGCACTTTGTATCTGGCTTTGGTCCGGCTTTGTT 2267
 2268 ACCACGGTATGCTTCCCAGTAGATGTGGTGAAGAACTAGATACATGAACCTACCACAGGGCAGTACAAGAGCGCTATCAACTGGCC 2357
 2358 TGGACATGTTGCTAAAGAGGGGGCCAGCGCTTCTACAAGGgtgagctctctctctgactccaaagcacaactcactcgtllagg 2447
 2448 aatallgtaaaaaalgtltagcaalgcacalllgggacctalltagctllcaallctccactacaacctcaacctctlllll 2537
 2538 tgtttctttagatTTTGTCCCTCGTTCTAAGGTTGGGATCGTGAATGTTGTAIGTGTGTTCTATCGAACAAATCAAGAGAGCCAT 2627
 2628 GATGGTCAAAAAGAGAGGATTGACGACAGAAATCGAGATCCGTTTCAAGTTGACTGAAAAACCTGATGCACCCTGGGTGGAA 2717
 2718 ATCCCTGGAGAAACCTAATGAATATCAATTCACATTTAGTTTATTCTATTGTCCTATTGGCACAAGAAGAAATCCTTTGTTGAAA 2807
 2809 AAGGAATATTGGACAATCTACCTCTATTTGACTATATGTTGAACCTGATGTGTAAGAAAGAAATGCAGTTGTATCTTTATTTATAATTT 2897
 2898 TTCATAATGAATCCATTCAAAATTTAATCGGAGATAATGGTCTAACACTAGTGTGTATAACACCTTTGGGAGGGTGTAGTTGCACT 2987
 2988 TTAAGACGTGTAATCTAAATCTCCAATTAATATTTTAGGCAGCTTAAACAGTACACCTTTATATGGGAAATAATCTGGTACCCAT 3077
 3078 AATAAATTCACAGGTTTATGTAACCAT 3106

图 1 鳊 UCPI 基因序列及内含子/外显子结构和 5'侧翼区 DNA 序列分析
 起始密码子(ATG)、终止密码子(TGA)黑体表示,多聚腺苷酸信号序列(AATAAA)以粗下划线表示,5'侧翼区 DNA 序列和内含子以小写字母表示,推测的调控元件以下划线表示

Fig.1 The UCPI gene sequence of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) and analysis of DNA sequence of the 5'-flanking region

The ATG start codon and TAA translation stop codon are boldfaced. The double underlined (AATAAA) is polyadenylation signal. The introns are lowercase. The sense strand is displayed from the 5' to 3' direction. Putative regulatory elements identified in the sequence are underlined

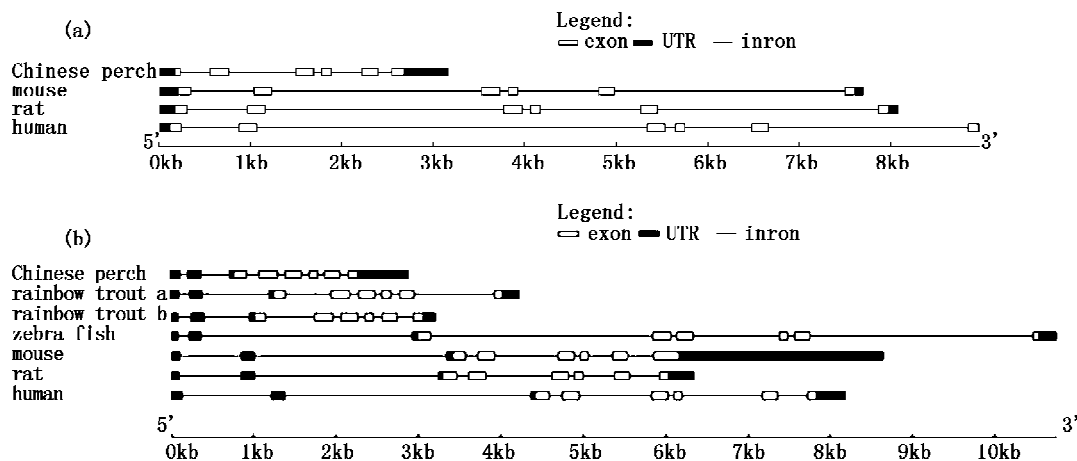


图2 鳊 UCP1 (a)、UCP2 (b) 基因结构示意图
Fig. 2 Schematic representation of the exon-intron structure of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) UCP1 (a) and UCP2 (b) genes

2.3 鳊 UCP1、UCP2 氨基酸序列的同源性分析

鳊 UCP1、UCP2 推测的氨基酸分子量大小分别为 34.38、33.45 ku, 等电点分别为 10.09 和 9.83。且均具有线粒体内膜载体蛋白 PLDTAKVRL、PTDVVKVRF 和 PVDVVKTRY 三个特征结构,并具有解偶联蛋白的 6 个跨膜 α -螺旋结构域、嘌呤核苷酸结合域 (PNBD) 以及解偶联蛋白的标签序列。鳊属鲈形目鲈科,其 UCP1 与鲤、人、小鼠和大鼠 UCP1 氨基酸序列的同源性分别为 82.0%、57.3%、55.7% 和 55.7% (图 4)。鳊 UCP2 与鲤、草、鲢、斑马鱼 UCP2 氨基酸序列同源性分别为 81.4%、81.4%、81.1% 和 81.1%, 与人、大鼠、小鼠、非洲爪蟾 UCP2 氨基酸序列的相似性分别为 77.2%、78.5%、78.2%、76.9% (图 5)。

2.4 多种生物 UCPs 系统进化分析

系统进化树显示,不同物种的 UCPs 主要聚为两大簇,UCP1 ~ UCP3 聚为一簇,UCP4 和 UCP5 聚为一簇。鳊 UCP1 与鱼类 UCP1 聚为一支与哺乳类 UCP1 分支区分明显。另外,属鲈形目的鳊 UCP2 与鲤形目、鲑形目鱼类、两栖类、哺乳类 UCP2 各形成一明显分支,UCP2 系统发生树显示较低等的鲤形目与哺乳动物的亲缘关系较鲈形目与哺乳动物的更近,这与基于形态学的鱼类系统发育研究的结论一致(图 6)。有趣的是,斑马鱼的 UCP3 和 UCP4 与鱼类 UCP1 聚为一支,其具体进化地位还需进一步研究确定。

2.5 鳊不同组织 UCP1、UCP2 基因的表达水平

半定量 RT-PCR 法分别检测鳊 UCP1、UCP2 mRNA 在肝脏、肠道、肌肉、脾、脑和脂肪组织中的相对表达量,以鳊 β -肌动蛋白基因作为外参照。结果表明,鳊 UCP1 mRNA 在肝脏大量表达,在肠道少量表达,而在脾脏、肌肉、脑、脂肪组织中未检测到表达;UCP2 mRNA 则在脂肪组织大量表达,在肌肉、肠道、少量表达,而在脾、肝脏和脑中未检测到表达(图 7)。

3 讨论

研究从鳊肝脏获得 UCP1、UCP2 基因组全序列分别为 3 146、2 890 bp,分别编码 313、312 个氨基酸。鳊 UCP1 基因结构在小鼠、大鼠、人和鱼中高度保守,均由 6 个外显子和 5 个内含子构成,每个外显子都有编码序列,均编码一个跨膜结构域。鳊 UCP2 基因由 8 个外显子和 7 个内含子构成,包含 2 个非翻译外显子。UCP1、UCP2 与鱼类氨基酸序列的同源性较高,与人、小鼠氨基酸序列的同源性也高于 55%,说明 UCP1、UCP2 在不同物种中相对保守。同时,与 UCP1、UCP2 进化亲缘远近关系一致的结果也通过系统进化树的建立被证明。另外,我们的研究发现鳊 UCP1 和 UCP2 的第 1、2、4 个 α -螺旋和第 2 个基质环均含有标签序列,其中,第 1 个 α -螺旋和第 2 个基质环中的标签序列可能与脂肪酸结合转运位点有关。

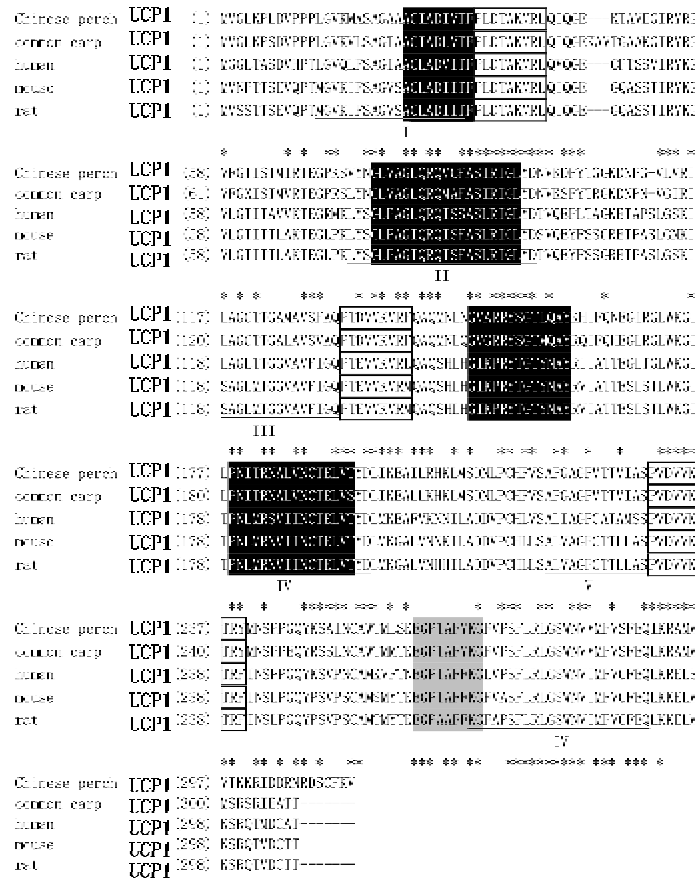


图4 鳊UCP1推测氨基酸序列及与其它鱼类、哺乳类UCP1氨基酸序列同源性的比较
氨基酸序列中的“-”表示比较时必要的氨基酸缺口，“*”表示保守的氨基酸残基，线粒体内膜载体蛋白的3个特征结构域以方框表示，并具有解偶联蛋白的6个跨膜 α -螺旋结构域以下划线表示，嘌呤核苷酸结合域(PNBD)以阴影表示，解偶联蛋白的标签序列用白字黑底表示

Fig.4 Alignment of the amino acid sequences of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) UCP1, other fish and mammals

The amino acid sequences of dashes indicate the amino acid gaps that are necessary to align these sequences. Asterisks indicate the amino acids conserved among all members of the enzymes. Six transmembrane α -helix domains are underlined. Three mitochondrial carrier protein motifs are boxes. purine-nucleotide binding domain (PNBD) are lightly shaded. UCP signature motifs are typed in white letters on black

我们选择6个在哺乳动物中表达或诱导表达UCP1、UCP2的组织,进行鳊UCP1、UCP2 mRNA表达水平的研究。研究发现,鳊UCP1 mRNA仅限于在肝脏、肠道中表达,肝脏中的表达量是肠道中的3倍多,在其它4个组织中未检测到表达。UCP1是哺乳类褐色脂肪组织的解偶联蛋白,它允许质子重新回到基质,使呼吸与ATP合成解偶联,从而使生物氧化产生的能量以热的形式散发,是啮齿类动物非颤抖产热的重要机制,这种产热机制对冷环境中生命的存在十分重要^[2,7]。而鲤UCP1基因主要在肝脏中表达,暴露于冷环境则表达量急剧减少,这与哺乳动物UCP1的表达调控正好相反,在鳊中也检测到与鲤肝脏高度表达UCP1一致的结果。鲤UCP1基因也在脑中表

达,冷诱导后表达量提高2倍,线粒体质子泄漏特征与哺乳动物相似^[2,7],但在正常鳊脑中未检测到UCP1表达,而肠道则检测到表达。

鳊UCP2 mRNA在脂肪组织、肌肉、肠道、肝脏中均有表达,脂肪中的表达量最高,肌肉、肠道次之,肝脏表达量极低,在脾、脑组织中未检测到表达。鳊UCP2在肝脏中极微表达,与哺乳动物类似。大鼠UCP2限于在肝脏Kupffer细胞内表达^[7];正常小鼠肝细胞不表达UCP2,只有患脂肪肝的小鼠肝细胞才表达^[9]。鱼类肝脏脂肪含量高,除了作为主要的代谢器官外,也部分作为鱼类的贮脂器官之一^[10]。鳊是肉食性鱼类,长时间接触食物中的大量脂肪,肝脏脂肪含量较高,UCP2基因在脂肪组织及肠道中的高表达也许是避免脂

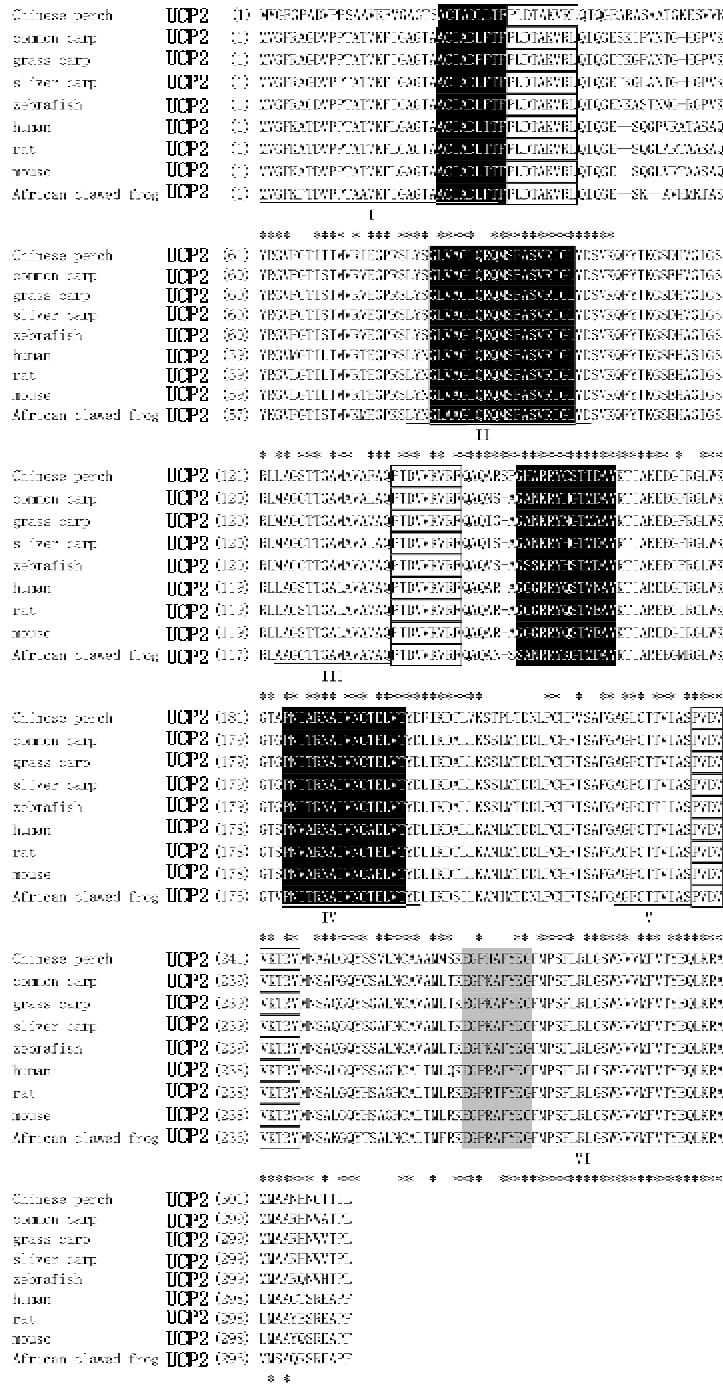


图 5 鳊 UCP2 推测氨基酸序列及与其它鱼类、哺乳类 UCP2 氨基酸序列同源性的比较

氨基酸序列中的“-”表示比较时必要的氨基酸缺口,“*”表示保守的氨基酸残基,线粒体内膜载体蛋白的 3 个特征结构域以方框表示,并具有解偶联蛋白的 6 个跨膜 α -螺旋结构域以下划线表示,嘌呤核苷酸结合域(PNBD)以阴影表示,解偶联蛋白的标签序列用白字黑底表示

Fig.5 Alignment of the amino acid sequences of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) UCP2, other fishes, mammals and amphibian

The amino acid sequences of dashes indicate the amino acid gaps that are necessary to align these sequences. Asterisks indicate the amino acids conserved among all members of the enzymes. Six transmembrane α -helix domains are underlined. Three mitochondrial carrier protein motifs are boxes. purine-nucleotide binding domain (PNBD) are lightly shaded. UCP signature motifs are typed in white letters on black.

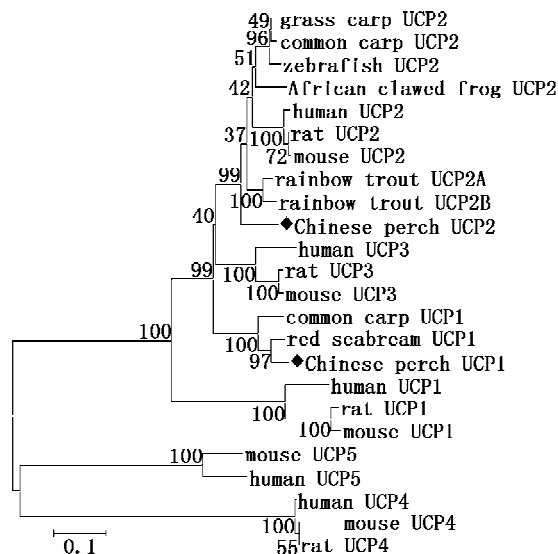


图6 鳊UCP1、UCP2 和其它生物的UCPs 氨基酸系统进化树

采用 Mega 3.1 软件的 NJ 法构建系统树,1 000 次重复计算靴带值;比例尺 =0.1,表示物种间的进化距离

Fig.6 Phylogenetic tree of uncoupling protein based on amino acid sequences of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) and other species

The tree was constructed by the neighbor-joining bootstrap using the Mega 3.1 software. Numbers are bootstrap values for 1 000 trials; Bar = 0.1, the bar indicates the evolutionary distance between the groups

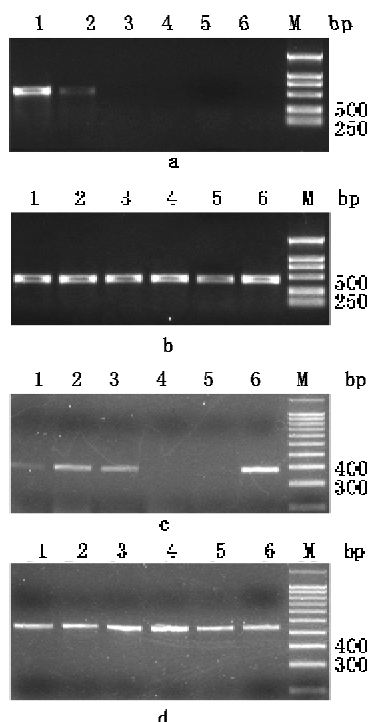


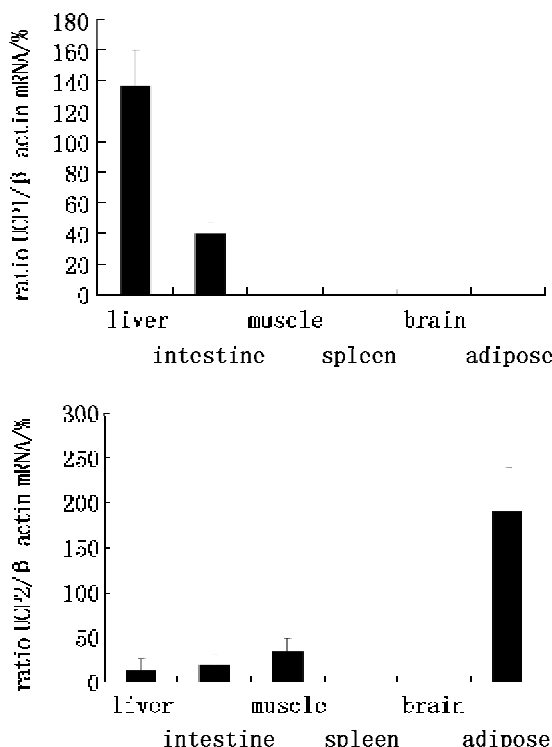
图7 鳊不同组织 UCP1 (a)、 β -肌动蛋白 (b)、UCP2 (c) 和 β -肌动蛋白 (d) mRNA 表达的 RT-PCR 分析 M. marker;1. 肝脏;2. 肠道;3. 肌肉;4. 脾;5. 脑;6. 脂肪

Fig.7 Analysis of UCP1 (a), β -actin (b), UCP2 (c) and β -actin (d) mRNA expression in different tissues of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) by RT-PCR

M. marker; 1. liver; 2. intestine; 3. muscle; 4. spleen; 5. brain; 6. adipose tissue

肪代谢过程对机体的氧化损伤。在高脂肪诱导下 UCP2 的低表达将成为今后脂质代谢研究的热点。虹鳟在禁食初期肌肉中 UCP2B mRNA 表达量升高,与其它脊椎动物 UCP2 表达模式相似,在继续喂食后表达量降低^[11-12]。鳊肌肉组织 UCP2 的高表达,是由于饥饿还是其它代谢的结果也将成为新的研究问题。另外,Jastroch 等^[13]发现 *A. flavipes* UCP2 mRNA 在富含巨噬细胞的组织如肺和脾中表达最强。敲除 UCP2 基因的小鼠巨噬细胞活性增强,这些小鼠对刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 感染有强抵抗力,这暗示缺失 UCP2 导致巨噬细胞 ROS 合成增加,杀灭病原活性增强^[14]。这些研究提示 UCP2 在免疫应答反应中起着重要作用。然而,我们在鳊脾脏中未检测到 UCP2 表达。鳊脾脏不表达 UCP2,可能与鱼类脾脏与哺乳类脾脏在免疫系统中的不同作用相一致。与哺乳类不同,头肾在鱼类免疫系统具有与脾脏在哺乳类中相似的重要作用,鳊头肾 UCP2 的表达亟待进一步研究。

由于 UCP2 与 UCP1 存在较高同源性,所以最初对于 UCP2 的研究主要集中于与 UCP1 相似



的参与生热作用的生理功能^[15-16]。但大量研究发现 UCP2 尚有许多 UCP1 所不具有的功能^[17-18]。本研究通过对鳊 UCP1、UCP2 基因结构、功能、系统进化地位、组织表达水平的系统分析,探索了鱼类 UCP1、UCP2 在其产热、脂肪代谢等生理机能中的重要作用。此外,UCP1、UCP2 基因组织表达模式的调控也值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Krauss S, Zhang C Y, Lowell B B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(3): 248-261.
- [2] Jastroch M, Wuertz S, Kloas W. Uncoupling protein 1 in fish uncovers an ancient evolutionary history of mammalian nonshivering thermogenesis [J]. *Physiol Genomics*, 2005, 22(2): 150-156.
- [3] Mark F C, Lucassen M, Pörtner H O, et al. Thermal sensitivity of uncoupling protein expression in polar and temperate fish [J]. *Comp Biochem Physiol(D)*, 2006, 1: 365-374.
- [4] Krauss S, Zhang C Y, Lowell B B. A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2 [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99: 118-122.
- [5] Krauss S, Zhang C Y, Scorrano L, et al. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic β cell dysfunction [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112: 1831-1842.
- [6] Liao W Q, Liang X F, Wang L, et al. Structural conservation and food habit-related liver expression of uncoupling protein 2 gene in five major Chinese carps [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2006, 39(4): 346-354.
- [7] Jastroch M, Buckingham J A, Helwig M, et al. Functional characterisation of UCP1 in the common carp: uncoupling activity in liver mitochondria and cold-induced expression in the brain [J]. *J Comp Physiol B*, 2007, 177: 743-752.
- [8] Larrouy D, Laharrague P, Carrera G, et al. Kupffer cells are a dominant site of uncoupling protein 2 expression in rat liver [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 235(3): 760-764.
- [9] Cortez-Pinto H, Zhi L H, Qi Y S, et al. Lipids up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes [J]. *Gastroenterology*, 1999, 116: 1184-1193.
- [10] Ando T, Watanabe S. A new method for fractionation of protamines and the amino acid sequences of salmine and three components of iridine [J]. *Int J Protein Research*, 1969, 1(3): 221-224.
- [11] Issa C, Scott A G, Yniv P, et al. Genomic structure and expression of uncoupling protein 2 genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *BMC Genomics*, 2006, 7: 203.
- [12] Coulibaly I, Gahr S A, Yao J, et al. Embryonic expression of UCP2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2006, 32: 249-253.
- [13] Jastroch M, Withers K, Klingenspor M, et al. Uncoupling protein 2 and 3 in marsupials: identification, phylogeny, and gene expression in response to cold and fasting in *Antechinus flavipes* [J]. *Physiol Genomics*, 2004, 17: 130-139.
- [14] Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, et al. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production [J]. *Nat Genet*, 2000, 26(4): 435-439.
- [15] Stuart J A, Harper J A, Brindle K M, et al. Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1413: 50-54.
- [16] Alexander P K, Randy W R, Adrian K W, et al. Shivering, muscle tone, and uncoupling proteins in a developing marsupial, the Tasmanian bettong (*Bettongia gaimardi*) [J]. *J Thermal Biol*, 2007, 32: 282-292.
- [17] Ricquier D, Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP [J]. *Biochem J*, 2000, 345(2): 161-179.
- [18] Boss O, Hagen T, Lowell B B. Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism [J]. *Diabetes*, 2000, 49(2): 143-156.

Cloning, sequence analysis and tissue expression of UCP1, UCP2 in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)

WANG Lin¹, LIANG Xu-fang¹, LI Guang-zhao¹, LIU Xiu-xia¹, LIN Qun¹, BAI Jun-jie²

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

2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: To better understand the relation of UCP1, UCP2 to the physiology mechanism of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*), UCP1, UCP2 gene sequence and exon/intron structure were obtained from Chinese perch by PCR and RACE method. Using β -actin as external control, six tissues UCP1, UCP2 gene expression specificity of Chinese perch were also studied by RT-PCR. The UCP1, UCP2 gene sequences were 3 146 bp, 2 890 bp in length. ORF were 942 bp, 939 bp and the deduced protein sequences are 313, 312 amino acids respectively. UCP1 included 5 introns and 6 exons and UCP2 has 7 introns and 8 exons. In the deduced amino acid sequence of UCP1, UCP2, three mitochondrial carrier protein motifs, the UCP signature motifs, six transmembrane α -helix domains and the putative purine-nucleotide binding domain (PNBD) both were found. The UCP1 mRNA is primarily expressed in liver, and low level of expression can also be detected in intestine. The UCP1 mRNA was not detectable in spleen, muscle, brain and adipose tissue. In contrast, the UCP2 mRNA is ubiquitous in four selected tissues. The high abundance was observed in adipose tissue, muscle and intestine, and low abundance was observed in liver. Brain has no expression. The data indicated that tissue specificity of Chinese perch UCP1, UCP2 mRNA probably relates to their feed habits, physiology role, and mRNA expression level may be greatly affected by ROS production in different tissues.

Key words: *Siniperca chuatsi*; uncoupling protein 1, 2; gene cloning; sequence analysis; tissue expression