

吉富罗非鱼 *FAS* 基因的克隆及再投喂和 饲料脂肪水平对其表达的影响

王爱民^{1,2}, 韩光明^{1,2}, 韦信键², 刘波¹, 吕富²,
封功能², 齐志涛², 王恬^{1*}, 徐跑^{1*}, 杨志刚³

(1. 南京农业大学无锡渔业学院,农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室,江苏 无锡 214081;

2. 盐城工学院海洋技术系,江苏省沿海池塘养殖生态重点实验室,江苏 盐城 224051;

3. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

摘要: 分离、克隆了吉富罗非鱼脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, *FAS*)基因的部分 cDNA 片段,共 557 bp,编码 185 个氨基酸,序列分析表明吉富罗非鱼 *FAS* 与其他物种的相似性为 62%~82%。为了研究饲料中脂肪对吉富罗非鱼 *FAS* 活性和表达的影响,设置 3 组含不同脂肪含量的等氮饲料组(3.71%组、7.67%组和 16.55%组),饲养 90 d,禁食 48 h,测定吉富罗非鱼肝脏中 *FAS* 的生物活性,使用实时荧光定量 PCR 分别测定了饲喂 3.71%组、7.67%组和 16.55%组饲料的吉富罗非鱼肝脏和肌肉中 *FAS* mRNA 的表达丰度以及再投喂后 6、12、24、48 h 肝脏中 *FAS* mRNA 的表达丰度。结果显示,饲料脂肪水平对肝脏中 *FAS* 活性无显著影响($P>0.05$);肝脏中 *FAS* mRNA 的表达丰度显著高于肌肉($P<0.05$),肝脏和肌肉中 *FAS* mRNA 的表达丰度随着饲料中脂肪水平增加而显著下降($P<0.05$);再次投喂后 6~48 h,各个组的肝脏中 *FAS* mRNA 表达丰度显著下降($P<0.05$)。结果说明,吉富罗非鱼肝脏中 *FAS* mRNA 的表达丰度高于肌肉,饲料脂肪水平能够抑制 *FAS* mRNA 表达,脂肪水平越高抑制作用越明显,再投喂后 6~48 h, *FAS* 基因的表达受到抑制。

关键词: 吉富罗非鱼;脂肪酸合成酶;脂肪水平;克隆;表达

中图分类号: Q 785; S 963

文献标识码: A

脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, *FAS*)又称脂肪酸合酶,是内源性脂肪酸合成的关键酶,能够催化丙二酰辅酶 A、乙酰辅酶 A 和还原型辅酶 II 体内合成为长链(16 碳)饱和软脂酸盐。*FAS* 含 7 个催化结构域和一个 4 磷酸泛酰巯基乙胺辅基,在脂肪酸合成酶中,底物和中间产物分子在各个功能结构域(可以位于同一酶分子,也可以位于不同酶分子)中传递直到完成脂肪酸的整个合成过程,活性形式的 *FAS* 是以头尾相对排列的二聚体形式,参与细胞的能量供给等多种生物学功能^[1]。对于 *FAS* 的基因克隆及饲料中营养素对其表达的影响研究以畜禽方面较多^[2-6],并已经获得大鼠 *Rattus*

norvegicus(AAA41145.1),马 *Equus caballus*(XP_001491342.1),山羊 *Capra hircus*(ABB36643.1),果蝇 *Monodelphis domestica*(XP_001370481.1),鸡 *Gallus gallus*(NP_990486.1)等动物 *FAS* 基因序列。有关鱼类 *FAS* 基因克隆及营养素对 *FAS* 活性、*FAS* mRNA 表达的影响方面研究甚少,仅在黑青斑河豚 *Tetraodon nigroviridis*(CAF94659.1),斑马鱼 *Danio rerio*(XP_687387.2)等鱼类中克隆得到 *FAS* 基因,马晶晶等^[7]报道饲料较高水平的 n-3HUFA(>0.88%)对黑鲷幼鱼 *FAS*、HSL 活性及基因表达影响显著,低水平时则无显著影响。对多数鱼类的研究发现,鱼体内与脂肪合成相关酶的活

收稿日期:2010-02-18 修回日期:2010-04-19

资助项目:农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室重点开放课题(BZ2007-06);江苏省 2008 年度省高校自然科学基金基础研究项目(08KJD240003);江苏省“青蓝工程”优秀青年骨干教师培养基金项目

通讯作者:王恬, E-mail:twang18@163.com; 徐跑, E-mail:Lxup@ffrc.cn

性会随着食物中脂肪含量的增加而降低,如高脂肪的食物会降低银大麻哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch* Wal-baum)、大西洋鲑 (*Salmo salar*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 等许多种鱼类的脂肪合成酶的活性^[8]。同时也有报道表明鱼类脂肪合成酶的活性对食物中脂肪含量增加的反应不像哺乳动物那么敏感,一般哺乳动物(如大鼠)食物中的脂肪含量达3%~4%时,体内脂肪酸的合成就受到限制,而鱼类(如鲑类)食物中脂肪含量>10%时才会出现相同的影响^[8-9]。

吉富罗非鱼是遗传性状改良后的尼罗罗非鱼 (genetic improvement of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus*), 英文缩写为 GIFT, 中文称为吉富, 现已成为中国一个新的重要养殖品种, 该品系生长速度快、鱼体高、背厚、出肉率高、遗传性状稳定^[10]。FAS 是脂肪代谢的关键酶之一, 与脂肪酸合成及脂肪沉积关系密切, 研究其在吉富罗非鱼中的作用及其机理具有重要意义, 关于吉富罗非鱼脂肪代谢, 尤其是 FAS 基因克隆及饲料中脂肪水平对吉富罗非鱼表达的影响还未见报道。本研究分离了吉富罗非鱼 FAS 的 cDNA 的部分序列, 对其序列进行比较和分析, 并应用实时定量 PCR 检测饲料中脂肪不同水平对吉富罗非鱼 FAS mRNA 的表达丰度的影响, 确定饲料中脂肪对吉富罗非鱼 FAS 基因表达的影响, 为进一步探讨 FAS 的功能、作用机理及调控鱼类脂肪沉积的研究提供参考性资料。

1 材料与方 法

1.1 实验设计和试剂

实验设计 吉富罗非鱼幼鱼是购自中国水产科学院淡水渔业中心种苗基地同一批孵化鱼苗, 体重 2.6 g 左右, 体长 4.36 cm 左右。先用普通颗粒饲料喂养 2 周让其适应环境后, 选择健康无伤病的试验鱼。参考 SC/T1025—2004 罗非鱼配合饲料行业标准设计配方, 以优质进口鱼粉、豆粕为蛋白源, 优质鱼油为脂肪源, 饲料原料均过 60 目筛, 鱼油的添加水平分别为 2%、6% 和 15%, 饲料脂肪水平分别为 3.71%、7.67% 和 16.55%, 配制成 3 组试验饲料, 每组设置 3 个重复, 每个重复 35 尾鱼, 养在规格 100 cm × 80 cm × 60 cm 的室内循环养殖水族箱中, 饲养 90 d。饲养遵循“四定”(定质、定量、定时、定点)、“三看”

(看水质、看水温、看鱼情)原则, 每天投饲 3 次, 时间分别为 6:30, 13:30, 18:30, 投饲率为 10%~15%, 投喂之前吸除粪便。试验用水为曝气后的自来水, 水温 21~27 °C, pH 6.8~8.0, 溶解氧 >5 mg/L。在试验开始时, 取驯化好的吉富罗非鱼幼鱼 3 尾, 取新鲜约 50~100 mg 的吉富罗非鱼肝脏用作 cDNA 的分离。试验结束后, 采样前先饥饿 48 h, 然后每个水族箱(每个平行组)取 3 尾鱼肝脏及肌肉, 在禁食 48 h 及再次投喂后 6、12、24、48 h 取肝脏样品, 样品存于 -70 °C 超低温冰箱留作分子生物学分析。

主要试剂及仪器 FAS 活性测定试剂: 乙酰辅酶 A、还原型辅酶 II (NADPH) 及 Malonyl coenzyme A lithium salt 均来自 sigma 公司; 二硫苏糖醇 (DL-Dithiothreitol, DTT)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES, free acid) 来自碧云天生物技术研究所。

抽提 RNA 用 Trizol Reagent (Promega)、反转录酶 *M-MLV*、*RnaseH*、*TdT* 酶、*Taq* 酶、连接酶、SYBR[®] ExScript[™] RT-PCR Kit 均购自 Takara (大连); *Taq* 酶、胶回收试剂盒、pUCm-T 载体购自上海申能博彩生物科技有限公司。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 由本试验室保存。除了定量 PCR 用进口配套 PCR 管外, 其他均购自上海申能博彩生物科技有限公司, 其他常规化学药品均为分析纯以上。

PCR 仪为 Eppendorf Mastercycler personal, 荧光定量 PCR 仪为 Mini-Opticon (Bio-RAD), 紫外分光光度计为 Eppendorf 公司, 离心机, 电泳仪等常规仪器均为国产。

1.2 方法

FAS 酶液制备与活性测定 酶液的调制采用 Utter 等^[11]的方法, 并进行了一部分修正。具体方法是在冷的 0.25 mol/L 蔗糖和 1 mmol/L EDTA-2Na 2 mL 溶液中剪取 1 g 肝脏, 用剪刀初步剪碎后再用组织匀浆机匀浆, 在 12 000 r/min、4 °C 条件下离心 60 min。将上清液的一部分用 0.25 mol/L 蔗糖和 1 mmol/L EDTA-2Na 溶液稀释 3 倍, 作为 FAS 活性测定的酶液。FAS 活性测定依据 Gibson 等^[12]的方法并进行了部分修改。方法如下: 吸光杯中依次加入 11.05 mmol/L β -NADPH 溶液 0.02 mL, 7.25 mmol/L Acetyl-CoA 溶液 0.02 mL, 40 °C 的 HEPES 缓冲溶液 0.4 mL, 用 40%

KOH 溶液调节 pH 值为 7.4 的 0.2 mol/L EDTA-2Na 溶液,混合后定容至 35 mL 0.7 mL,酶液 0.04 mL,混合均匀后,加入 3.51 mmol/L Malonyl-CoA 溶液 0.04 mL,迅速震动混合后,使用分光光度计(UV-2100,日本岛津)在 340 nm 波长下测定吸光度,空白对照试验使用去离子水进行。

酶活性计算公式如下:

$$E = [V / (\varepsilon \times D \times P \times v)] \times [\Delta e / \Delta t] \times 1000 \text{ (nmol / (min} \cdot \text{mg))}$$

式中, V 为反应溶液最终总量(mL), ε 为 340 nm 测定时 NADPH 的分子吸光度系数(6.230), D 为光路长(1 cm), v 为酶液量(mL), P 为蛋白质浓度(mg/mL), $\Delta e / \Delta t$ 为单位时间内的吸光度变化。

引物设计与合成 根据已知鱼类 GenBank 中 *FAS* 基因的保守片断,使用 Codehop 原理设计引物 Primer 1(5'- TTT GAG ATG TGC TCA CAG CTG CA-3')、Primer 2(5'- TCA GCC AGT GAG CTG TGG ATG AT -3')。根据罗非鱼 β -actin 的序列(GenBank:EF026001)设计荧光定量 PCR 引物 Primer 3(5'- GAC ACC TCG CCA TCA CAG ACC TC-3')、Primer 4(5'-TGG ACC TAA TCA CCT CCG CTC ACA -3')。所有引物均由上海捷瑞生物工程技术有限公司合成。

总 RNA 的抽提 取新鲜的约 50 ~ 100 mg 的吉富罗非鱼肝脏,用 Trizol Reagent 根据说明书操作,抽提总 RNA。使用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度,并根据 OD_{260/280} 值判断 RNA 的质量,一般为 1.9 ~ 2.0。

部分片段的分离 取肝脏中抽提的总 RNA 5 μ g,合成 cDNA,然后用 10 % RT 液,使用引物 P₁ 和 P₂ 扩增 *FAS* 的部分片段。PCR 反应体系为 25 μ L,其中含模板 2 μ L,2.5 μ L 10 \times Buffer,2 μ mol/L MgCl₂,200 μ mol/L dNTP,引物各 0.1 μ mol/L,0.125 U *Taq* 酶。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 3 min,然后 30 次循环 94 $^{\circ}$ C 1 min,58 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,最后 72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。扩增液用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离,切胶,使用胶回收试剂盒回收,用 pMD18-T 载体克隆,酶切鉴定,送上海英骏生物技术有限公司进行测序。

序列分析 所获得的 cDNA 序列应用 DNA TOOL 6.0 进行拼接和推导氨基酸序列,用软件 ClustalW 1.81 进行序列分析和比较。

Real-time PCR(RT-PCR) 采用 SYBR green

I 嵌合荧光法进行 real-time PCR 扩增反应(Mini Option Real-Time 仪器, BIO-RAD, USA)。用 500 mg 总 RNA,以大连 Takara 公司反转录试剂盒进行 RT 反应,反应总体积为 10 μ L,然后以此 RT 液为模板进行 real time PCR。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 3 min,然后 45 个循环 94 $^{\circ}$ C 10 s,62 $^{\circ}$ C 20 s,最后 72 $^{\circ}$ C 3 min,4 $^{\circ}$ C 保存。为检验反应的特异性,扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳。以罗非鱼 β -actin 为内参,对得到的各样品 C 值进行均一化处理,以基础饲料组禁食时 *FAS* 基因的表达量为基准,应用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法^[13] 确定不同样品的 mRNA 的相对含量。

1.3 数据处理

实验数据用平均值 \pm 标准误差表示 (means \pm SE),数据用 SAS(9.0) 软件统计单因子方差分析 (One-way ANOVA),多重比较用 LSD 进行差异显著性检验比较分析以及独立样本 *t* 检验,取 *P* 值 0.05。

2 结果

2.1 吉富罗非鱼 *FAS* 基因的分离与克隆

以肝脏 cDNA 为模板,引物 Primer1 和 Primer2 扩增吉富罗非鱼 *FAS*。电泳结果显示,在约 500 bp 出现一明亮的特异性扩增带(图 1)。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳纯化,回收后克隆至 pMD18-T 载体,转化感受态,并利用正反向引物,通过 PCR 反应检测得到阳性克隆,阳性克隆由博亚公司进行测序。结果表明:吉富罗非鱼 *FAS* 部分基因序列长度为 557 bp,编码 185 个氨基酸(Genbank 登录号:GU433188)。

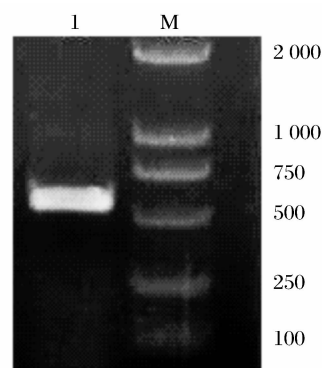


图 1 RT-PCR 扩增产物

1. 扩增产物; M. DL2000 marker。

Fig.1 The amplification product of RT-PCR

1. Amplification product; M. DL2000 marker.

1	TTT	GAG	ATG	TGC	TCA	CAG	CTG	CAG	ACC	CAG	AAT	CAG	CCT	GTG	GAG	TAC	CTG	TTT	CTC	TTT	61
1	F	E	M	C	S	Q	L	Q	T	Q	N	Q	P	V	E	Y	L	F	L	F	20
62	GAT	GGC	TCA	CAT	TCA	TAT	GTG	GCG	GCG	TAC	ACA	CAG	AGC	TAC	AGA	GCC	AAG	CTA	ACC	CCC	121
21	D	G	S	H	S	Y	V	A	A	Y	T	Q	S	Y	R	A	K	L	T	P	40
122	GGC	AAC	GAG	TCT	GAG	GCT	GAA	ACT	GAA	GCC	TTG	TGT	GCC	TTC	ATC	CAG	CAG	TTC	ACT	GGC	181
41	G	N	E	S	E	A	E	T	E	A	L	C	A	F	I	Q	Q	F	T	G	60
182	ATT	GAA	TAC	AAC	AAG	CTT	TTG	GAG	ACT	CTT	CTC	CCG	CTG	TCA	GAC	CTG	AAT	GCA	CGT	GTC	241
61	I	E	Y	N	K	L	L	E	T	L	L	P	L	S	D	L	N	A	R	V	80
242	AGT	GTG	GCC	GTG	GAC	CTA	ATC	ACC	TCC	GCT	CAC	AGG	GAC	ATC	GAC	CGA	GAC	TCA	CTG	CAC	301
81	S	V	A	V	D	L	I	T	S	A	H	R	D	I	D	R	D	S	L	H	100
302	TTT	GCA	GCC	TCT	GCC	TTC	TAC	TAC	AAG	CTA	AAG	GCT	GAT	GCA	TAT	GTA	CCT	TCT	GCA	361	
101	F	A	A	S	A	F	Y	Y	K	L	K	A	A	D	A	Y	V	P	S	A	120
362	AAA	TAC	CAC	GGC	AGT	GTG	AAG	CTG	CTG	CGC	GCC	AAA	ACC	AGC	AGC	GAA	TAT	GAG	CAA	AAC	421
121	K	Y	H	G	S	V	K	L	L	R	A	K	T	S	S	E	Y	E	Q	N	140
422	CTG	GGA	GCT	GAC	TAT	AAG	CTC	AGC	GAG	TCG	TGT	GAT	GGC	GAG	GTG	TCA	GTC	CAC	GTC	ATC	481
141	L	G	A	D	Y	K	L	S	E	V	C	D	G	E	V	S	V	H	V	I	160
482	GAG	GGA	GAT	CAC	CGC	ACT	TTC	CTA	GAA	GGC	GAG	GGG	GCG	GAG	TCT	ATC	AAG	AAC	ATC	ATC	541
161	E	G	D	H	R	T	F	L	E	G	E	G	A	E	S	I	K	N	I	I	180
542	CAC	AGC	TCA	CTG	GCT	GA															557
181	H	S	S	L	A																200

图2 吉富罗非鱼 *FAS* 基因 cDNA 部分序列和翻译的氨基酸序列Fig. 2 The partial nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of gift tilapia *FAS* cDNA

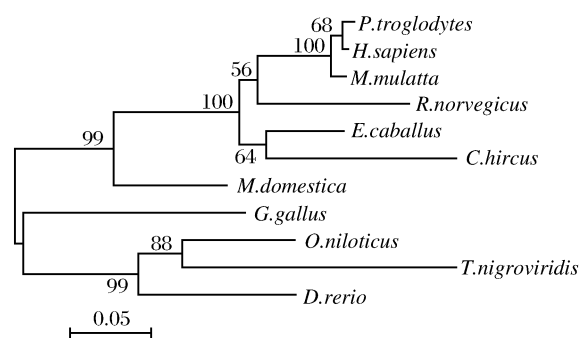
2.2 序列分析

使用 ClustalW1.8 把吉富罗非鱼 *FAS* 氨基酸序列与黑猩猩 (GenBank: XP_001167297.1), 人 (GenBank: AAH63242.1), 猕猴 (GenBank: XP_001113076.1), 大鼠 (GenBank: AAA41145.1), 马 (GenBank: XP_001491342.1), 山羊 (GenBank: ABB36643.1), 果蝇 (GenBank: XP_001370481.1), 鸡 (GenBank: NP_990486.1), 黑青斑河豚 (GenBank: CAF94659.1), 斑马鱼 (GenBank: XP_687387.2) 等 *FAS* 氨基酸序列进行同源性比较, 结果显示, 吉富罗非鱼 *FAS* 与硬骨鱼类的 *FAS* 序列相似性最高, 其中与斑马鱼、青黑斑河豚的相似性达到了 82%、78%; 此外, 吉富罗非鱼 *FAS* 与其它物种的 *FAS* 相似性同样较高, 与鸡、果蝇的相似性为 72%, 与大鼠、猕猴的相似性为 69%, 与人、黑猩猩、马的相似性为 68%, 与山羊的相似性为 62%。表明 *FAS* 在进化的过程中较为保守。序列比对显示, 本文所克隆到的基因在氨基酸水平上与其它物种的 *FAS* 具有高度的保守性, 是吉富罗非鱼的 *FAS* 基因。应用 MEGA4 软件 N-J 方法构建系统发育树 (图 3), 结果显示吉富罗非鱼和黑青斑河豚聚为一支, 再和斑马鱼聚为一支; 而黑猩猩和人聚为一支, 再和猕猴聚为一支, 这与传统的形态学和生化特征分类进化地位也基本一致。

2.3 饲料脂肪水平对吉富罗非鱼肝脏中 *FAS* 活性的影响

饲养试验结束后, 吉富罗非鱼饥饿 48 h 测定肝脏中 *FAS* 活性 (图 4)。结果表明, 随着饲料中脂肪水平增加, 吉富罗非鱼肝脏中 *FAS* 活性呈现下

降的趋势, 但各组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

图3 根据 NJ 法构建的 *FAS* 氨基酸序列系统树

所用序列的 GenBank 登录号为黑猩猩 (*P. troglodytes*, GenBank: XP_001167297.1), 人 (*H. sapiens*, GenBank: AAH63242.1), 猕猴 (*M. mulatta*, GenBank: XP_001113076.1), 大鼠 (*R. norvegicus*, GenBank: AAA41145.1), 马 (*E. caballus*, GenBank: XP_001491342.1), 山羊 (*C. hircus*, GenBank: ABB36643.1), 果蝇 (*M. domestica*, GenBank: XP_001370481.1), 鸡 (*G. gallus*, GenBank: NP_990486.1), 吉富罗非鱼 (*O. niloticus*, Genbank 登录号: GU433188), 黑青斑河豚 (*T. nigroviridis*, GenBank: CAF94659.1), 斑马鱼 (*D. rerio*, GenBank: XP_687387.2)。

节点处的数字为 1 000 次 bootstrap 检验的支持率。

Fig. 3 *FAS* sequence relationship from different species was shown in a phylogenetic tree on NJ method

The numbers were the percentage of bootstrap values supporting each node from 1 000 replicas.

2.4 饲料中脂肪水平及再投喂对吉富罗非鱼 *FAS* mRNA 表达水平的影响

试验结束后, 禁食 48 h, 取吉富罗非鱼肝脏和肌肉样品, 进行荧光定量 PCR 测定 *FAS* mRNA 表达丰度。总的来讲, 肝脏中 *FAS* mRNA 表达丰度

著度高于肌肉中 *FAS* mRNA 表达丰度 ($P < 0.05$) (图 5)。3.71% 组中无论肝脏还是肌肉中的 *FAS* mRNA 表达丰度均显著高于 7.76% 组和 16.55% 组 ($P < 0.05$), 7.67% 组和 16.55% 组肝脏和肌肉中 *FAS* mRNA 表达丰度差异不显著 ($P > 0.05$)。

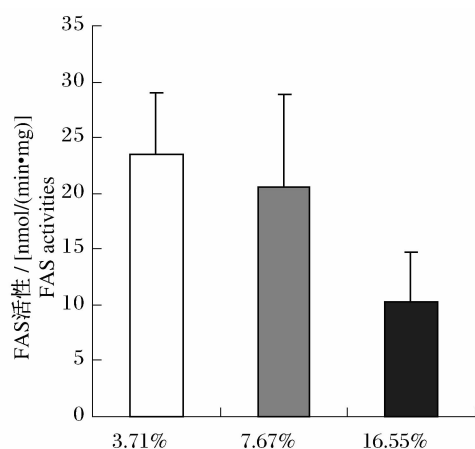


图 4 吉富罗非鱼肝脏 *FAS* 活性与饲料脂肪水平的关系
Fig. 4 The relationship between liver *FAS* activities and dietary lipid levels of gift tilapia

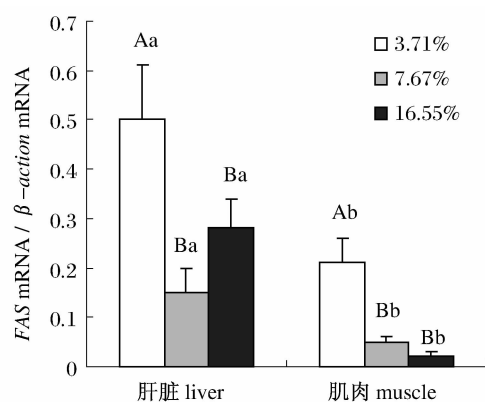


图 5 不同脂肪水平组中吉富罗非鱼肝脏和肌肉中 *FAS* mRNA 表达丰度

数值用平均值 \pm 标准误表示, $n = 9$, 不同大写字母表示同一组织中各组之间独立样本 t 检验差异显著 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示同一组中不同组织之间 LSD 多重比较差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 The expression abundance of liver and muscle *FAS* mRNA on different dietary lipid levels of gift tilapia

Values are means \pm SE, $n = 9$. Independent-Samples t -test; different capital superscript letter are significant different among different groups of the same tissue ($P < 0.05$); LSD multiple range test; different lower case letter are significant different among different tissues of the same group ($P < 0.05$).

肝脏是脂肪代谢中重要的器官, 本试验研究了禁食后 48 h 然后再次投喂, 分别在再次投喂后 6、

12、24、48 h 时取肝脏样品, 分析不同脂肪水平组中罗非鱼肝脏中 *FAS* mRNA 表达丰度在摄食后不同时间段的变化。从图 6 可以看出: 肝脏中 *FAS* mRNA 表达丰度在禁食后投喂不同脂肪水平饲料后, 不同时间段的变化差异显著 ($P > 0.05$)。再投喂后 6、12 h, 3.71% 组 *FAS* mRNA 表达丰度始终显著高于 16.55% 组 ($P < 0.05$), 投喂后 24、48 h, 各组 *FAS* mRNA 表达丰度的平均值有一定的波动, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。在 3.71% 组中, 在再次投喂后 6 h 到 24 h 之间, *FAS* mRNA 表达丰度显著下降 ($P < 0.05$), 24 h 到 48 h 之间无显著变化 ($P > 0.05$)。在 7.67% 组中, *FAS* mRNA 表达丰度在投喂后 6 h 最高, 且显著高于其他各个时间段 ($P < 0.05$)。在 16.55% 组中, 再投喂后其他各个时间段差异不显著 ($P > 0.05$)。

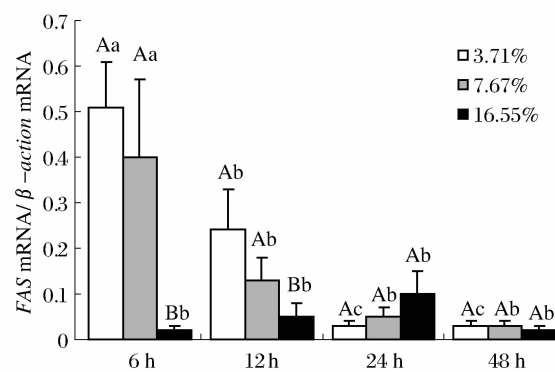


图 6 不同脂肪水平组再投喂后吉富罗非鱼肝脏中 *FAS* mRNA 表达丰度

数值用平均值 \pm 标准误表示, $n = 9$, 不同大写字母表示同一时间内各组之间独立样本 t 检验差异显著 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示同一组在不同时间内 LSD 多重比较差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 The expression abundance of liver *FAS* mRNA on refeding different dietary lipid levels of gift tilapia

Values are means \pm SE, $n = 9$. Independent-Samples t -test; different capital superscript letter are significant different among different groups of the same time ($P < 0.05$); LSD multiple range test; different lower case letter are significant different among different times of the same group ($P < 0.05$).

3 讨论

饲料中脂肪不仅涉及动物的饲料报酬、抗病力、繁殖性能及肉用类型, 而且关系到肌肉品质的风味。脂肪酸合成酶在动物体脂生成、沉积中发挥重要作用。本文通过同源克隆方法从吉富罗非鱼肝脏中分离到了 *FAS* 基因的部分片段, 氨基酸

序列比对显示该区域保守性较高,这表明克隆到的序列即为吉富罗非鱼 *FAS* 基因,为后续研究 *FAS* 基因表达量提供了有利的条件。另一方面也说明了 *FAS* 基因的高度保守性可以用来研究物种起源、进化及其亲缘关系。

脂肪酸合成酶蛋白的多寡、活性的高低对控制动物体脂沉积具有重要意义,鱼类脂肪酸合成主要在肝脏中进行^[14]。饲料营养素对鱼类脂肪酸合成酶的活性有显著影响,如马晶晶等^[7]报道饲料较高水平的 n-3 HUFA (>0.92%)使黑鲷幼鱼 *FAS* 活性显著下降 ($P < 0.05$);田娟等^[15]报道添加 400 mg/kg 肉碱显著降低 *FAS* 活性 47.3% ($P < 0.05$);Dias 等^[16]报道高豆粕饲料能降低欧洲鲈鱼肝脏中 *FAS* 的活性 ($P < 0.05$)。同时相关研究表明,饲料中脂肪水平越高,脂肪合成相关酶的活性越低^[17-18]。本试验吉富罗非鱼肝脏中 *FAS* 活性的测定结果显示,随着饲料脂肪水平提高,肝脏中 *FAS* 活性有降低的趋势,本研究进一步证实了高脂肪对鱼类有抑制脂肪酸合成酶活性分泌的作用,其可能原因是当外源的脂肪提供充足时,体内不需要合成大量的脂肪酸来参与脂肪的合成与沉积,从而导致体内脂肪酸合成酶活性的显著下降,但本试验同时表明,饲料中脂肪水平在 16.55% 以内,吉富罗非鱼肝脏中脂肪酸合成酶活性仅有下降的趋势,差异不显著 ($P > 0.05$),说明吉富罗非鱼脂肪合成酶的活性对食物中脂肪含量增加的反应不是太敏感,有报道表明鱼类脂肪合成酶的活性对食物中脂肪含量增加的反应不像哺乳动物那么敏感,一般哺乳动物(如大鼠)食物中的脂肪含量达 3%~4% 时,体内脂肪酸的合成就受到限制,而鱼类(如鲑类)食物中脂肪含量 >10% 时才会出现相同的影响,目前尚不清楚这种差异是否是由于酶活性调节方式不同而引起的^[9-10]。

动物合成脂肪的能力在不同组织中有所不同,兔、鼠等啮齿动物的肝脏和肌肉都是合成脂肪酸的主要场所,各占 50%^[19],而猪合成脂肪的主要场所是脂肪组织,鸡等禽类主要是通过肝脏来合成脂肪,占肌体脂肪的 90%^[20],河蟹肌肉中脂肪合成酶活性普遍较高,尤其是 ME 和 ICDH 酶活显著高于肝胰腺和卵巢,说明肌肉是河蟹合成脂肪的主要场所^[21],鱼类合成脂肪酸的主要场所是在肝脏^[22-24]。本试验显示,吉富罗非鱼肝脏中 *FAS* 基因的表达丰度比肌肉中较高,进一步说明

肝脏是鱼类合成脂肪酸的主要场所。

脂肪酸合成酶在动物体脂生成、沉积中发挥重要作用,日粮营养是影响 *FAS* mRNA 表达最重要的因素之一^[25]。马晶晶等^[7]报道饲料较高水平的 n-3 HUFA (>0.88%)对黑鲷幼鱼 *FAS*、*HSL* 活性及基因表达影响显著,低水平时则无显著影响;Blake^[26]研究了 PUFA(鱼油)和 SFA(牛脂)对大鼠肝脏生脂酶基因表达的影响,添加 PUFA 显著降低了肝脏中 *FAS* 和 Si_4 的 mRNA 丰度,分别为饲喂 SFA 日粮组的 6% 和 21%。Alvarez 等^[27]报道表明不饱和脂肪酸对虹鳟鱼的脂肪酸合成酶基因表达有直接调控的作用。已知编码啮齿类动物有关 *FAS* 的基因,如苹果酸脱氢酶,ACC,L-PK,*FAS*, Si_4 蛋白的表达在饲料中存在 n-3 或 n-6 PUFA 时,下降 60%~90%^[18]。本次试验发现高脂肪水平的饲料抑制了脂肪酸合成酶基因的表达,可能与饲料中较高的 PUFA 含量有关。饲料脂肪水平等于或大于 7.67% 时,吉富罗非鱼肝脏和肌肉中 *FAS* 基因表达丰度显著低于 3.71% 组,说明高脂肪水平的摄入,使鱼体的 *FAS* 基因表达受到抑制,从而减少体内的脂肪合成,直接利用饲料中的脂肪,经过一系列的酶促反应分解提供能量或参与机体物质的合成,另外还其原因可能跟饲料中的脂肪酸组成有关,本试验使用的脂肪源为鱼油,富含 n-3 PUFA,有研究认为不同的脂肪酸对 *FAS* 的抑制作用不一样,n-3 或 n-6 PUFA 是这些基因的强抑制剂,SFA 和 n-9 MUFA 对编码 *FAS* 的基因没有抑制作用^[26];n-3 PUFA 对 *FAS* 基因的转录抑制作用比 n-6 PUFA 的强^[28]。肝脏中 *FAS* mRNA 表达丰度在禁食和再投喂不同脂肪水平饲料后,不同时间段的变化有一定差异,禁食与投喂高脂肪含量饲料时,肝脏脂肪合成相关酶活性降低^[22-23]。饲养试验停止禁食后 48 h 肝脏中 *FAS* mRNA 表达丰度显著高于再次投喂后 48 h ($P < 0.05$),具体原因尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Menendez J A, Lupu R. Fatty acid synthase-catalyzed de novo fatty acid biosynthesis: from anabolic-energy-storage pathway in normal tissues to jack-of-all-trades in cancer cells [J]. Arch Immunol Ther Exp, 2004, 52(6): 414-426.
- [2] Mildner A M, Clarke S D. Porcine fatty acid

- synthase: Cloning of a complementary DNA, tissue distribution of its mRNA and suppression of expression by somatotropin and dietary protein [J]. *Nutr*, 1991, 121: 900-907.
- [3] 李军, 李晓宁, 杨坚, 等. 猪 *FAS* 基因的克隆及序列分析 [J]. *广西农业生物科学*, 2006, 25(1): 6-10.
- [4] 宋凯, 单安山. 不同小麦日粮对肉仔鸡肉质、脂肪酸合成酶 mRNA 与脂蛋白脂肪酶 mRNA 表达的影响 [J]. *动物营养学报*, 2008, 20(1): 69-74.
- [5] José A A, Gama M A, Lanna D D. Effects of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on gene expression and lipid metabolism of adipose tissue of growing pigs [J]. *Genet Mol Res*, 2008, 7(2): 284-294.
- [6] 夏蕾, 张志宏, 左金国, 等. 沙棘提取物对猪脂肪中部分脂肪代谢相关基因表达的影响 [J]. *营养学报*, 2009, 31(2): 177-180.
- [7] 马晶晶, 邵庆均, 许梓荣, 等. N-3 高不饱和脂肪酸对黑鲷幼鱼生长及脂肪代谢的影响 [J]. *水产学报*, 2009, 33(4): 639-648.
- [8] Dias J, Alvarez M J, Díez A, *et al.* Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Aquaculture*, 1998, 161(1-4): 169-186.
- [9] Boujard T, Gélinau A, Covés D, *et al.* Regulation of feed intake, growth, nutrient and energy utilisation in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed high fat diets [J]. *Aquaculture*, 2004, 231(1-4): 529-545.
- [10] Dey M M, Gupta M V. Socioeconomics of disseminating genetically improved Nile tilapia in Asia: an introduction [J]. *Aquaculture Economic and Management*, 2000, 4(1/2): 5-11.
- [11] Utter M F, Keech K B. Pyruvate carboxylase 1 nature of the reaction [J]. *Biol Chem*, 1963, 238: 2603-2608.
- [12] Gibson D M, Lyons R T, Scott D F, *et al.* Synthesis and degradation of the lipogenic enzymes of rat liver [J]. *Adv Enz Reg*, 1972, 10: 187-204.
- [13] Kenneth J L, Thomas D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [14] Greene D H S, Selivonchick D P. Lipid metabolism in fish [J]. *Progress in Lipid Research*, 1987, 26: 53-85.
- [15] 田娟, 冷向军, 李小勤, 等. 肉碱对草鱼生长性能、体成分和脂肪代谢酶活性的影响 [J]. *水产学报*, 2009, 33(2): 295-302.
- [16] Dias J, Alvarez M J, Arzel J, *et al.* Dietary protein source affects lipid metabolism in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)*, 2005, 142(1): 19-31.
- [17] Jantrarotai W, Sitasi P, Rajchapakdee S. The optimum carbohydrate to lipid ratio in hybrid *Clarias catfish* (*Clarias macrocephal* × *C. gariepinus*) diet containing raw broken rice [J]. *Aquaculture*, 1994, 127(1): 61-68.
- [18] Clarke S D, Armstrong M K, Jump D B. Nutritional control of rat liver fatty acid synthase and *Si4* mRNA abundance [J]. *Journal of Nutrition*, 1990, 120: 218-224.
- [19] Favarger P. Adipose tissue [M] // Renold A E, Cahill C F. *Handbook of physiology*, section 5. Washington D C: Am Physiol Soc, 1965: 19-25.
- [20] 尹靖东, 齐广海, 霍启光. 家禽脂类代谢调控机理的研究进展 [J]. *动物营养学报*, 2000, (2): 1-7.
- [21] 刘立鹤, 吴建开, 周永奎, 等. 中华绒螯蟹性腺发育期脂肪合成酶活性变化研究 [J]. *水利渔业*, 2005, 25(6): 18-20.
- [22] Lin H, Romsos D R, Tack P I, *et al.* Influence of dietary lipid on lipogenic enzyme activities in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) [J]. *Nutr*, 1977, 107: 846-854.
- [23] Lin H, Romsos D R, Tack P I, *et al.* Effects of fasting and feeding various diets on hepatic lipogenic enzyme activities in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* Walbaum [J]. *Nutr*, 1977, 107: 1477-1483.
- [24] Likimani T A, Wilson R P. Effects of diet on lipogenic enzyme activities in channel catfish hepatic and adipose tissue [J]. *Nutr*, 1982, 112: 112-117.
- [25] Choct M, Annison G. Anti-nutritive activity of wheat pentosans in broiler diets [J]. *British Poultry Science*, 1990, 31(4): 811-822.
- [26] Blake W L, Clarke S D. Suppression of rat hepatic fatty acid synthase and *Si4* gene transcription by dietary polyunsaturated fat [J]. *Journal of Nutrition*, 1990, 120: 1727-1729.
- [27] Alvarez M J, Díez A, López-Bote C, *et al.* Short-term modulation of lipogenesis by macronutrients in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes [J]. *Br J Nutr*, 2000, 84(5): 619-628.
- [28] Clarke S D, Jump D B. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription [J]. *Annual Review of Nutrition*, 1994, 14: 83-98.

**Molecular cloning of fatty acid synthase from gift tilapia
(*Oreochromis niloticus*): response of its expression
to refeeding and different lipid levels in diet**

WANG Ai-min^{1,2}, HAN Guang-ming^{1,2}, WEI Xin-jian², LIU Bo¹, LV Fu²,
FENG Gong-neng², QI Zhi-tao², WANG Tian^{1*}, XU Pao^{1*}, YANG Zhi-gang³

(1. Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology Certificated by
the Ministry of Agriculture, Wuxi College of Fisheries of Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China;

2. Department of Ocean Technology, Yancheng Institute of Technology, Key Laboratory of Aquaculture and
Ecology of Coastal Pool of Jiangsu Province, Yancheng 224051, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The fatty acid synthase (FAS) was cloned from liver of gift tilapia (*Oreochromis niloticus*). The obtained partial cDNA was 557 bp, which encoded 185 amino acids. Compared with other species FAS, the gift tilapia FAS shared 62% – 82% identities. To study the FAS activity and gene expression affected by different dietary lipid levels, three groups of different dietary lipid levels (3.71% group, 7.67% group and 16.55% group) were set up with the same nitrogen content. After feeding for 90 days, the fish fasted for 48 hours and then the liver FAS activity and FAS mRNA expression level in liver and muscle were studied; Further, the FAS mRNA expression level in liver was examined after refeeding with different lipid level dietary, at 6, 12, 24, 48 hours. Results showed that FAS activity in liver had no significant change with different dietary lipid levels ($P > 0.05$). The expression level of FAS mRNA in liver was significantly higher than that in muscle ($P < 0.05$). However, the expression level of FAS mRNA in both tissues of liver and muscle was significantly declined with the raising of the dietary lipid level ($P < 0.05$). After refeeding for 6 to 48 hours, the expression level of liver FAS mRNA was significantly declined in each group ($P < 0.05$). Those results indicated that the expression level of liver FAS mRNA was significantly higher than that in muscle. The dietary lipid level could inhibit the expression level of FAS mRNA, and the tendency is: the higher lipid level, the more obvious inhibition. After refeeding for 6 to 48 hours, the expression of FAS gene was impeded.

Key words: gift tilapia (*Oreochromis niloticus*); fatty acid synthase; lipid level; gene cloning; gene expression

Corresponding author: WANG Tian. E-mail: twang18@163.com; XU Pao. E-mail: xup@ffrc.cn