

文章编号:1000-0615(2012)05-0672-09

DOI:10.3724/SP.J.1231.2012.27730

## 异源四倍体鲫鲤及亲本 ApoE 的克隆及组织表达分析

王凤华<sup>#</sup>, 周毅<sup>#</sup>, 刘少军<sup>\*</sup>, 钟欢, 张纯, 陶敏, 刘筠

(湖南师范大学生命科学学院, 蛋白质化学与鱼类发育生物学教育部重点实验室, 湖南长沙 410081)

**摘要:** 载脂蛋白 E(Apolipoprotein E, ApoE)作为胆固醇代谢过程中的关键因子, 参与脂蛋白转运和性腺发育。为进一步了解该基因的作用, 本实验克隆并测序了异源四倍体鲫鲤及其父母本 ApoE 基因的全长序列。异源四倍体鲫鲤、红鲫和鲤的 ApoE 全长分别为 1393 bp、1384 bp 和 1396 bp, 均编码 281 个氨基酸。序列对比表明, 异源四倍体鲫鲤 ApoE 与父本鲤更为相似。另外有 2 个氨基酸位点发生了与父母本均不同的变异, 证明异源四倍体鲫鲤除了有杂交特征外也产生了变异。通过 Mega 软件构建的哺乳动物 ApoE 进化树与系统分类相一致: 鲤科鱼类的 ApoE 聚类在一起而分离于其它物种。Real time PCR 分析表明, ApoE 基因在 3 种鱼中的组织表达模式基本一致, 所有组织均有表达, 而在脾脏中表达最高。

**关键词:** 异源四倍体鲫鲤; 红鲫; 鲤; 载脂蛋白; 组织表达

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

载脂蛋白 E(Apolipoprotein E, ApoE)在细胞识别和胆固醇代谢过程中起重要作用。目前已经进行了广泛的研究。在人类中, ApoE 已被证实与多种疾病相关, 如高血压和动脉粥样硬化等<sup>[1-3]</sup>。近年来也有报道称, ApoE 与生殖发育有关。在性腺发育过程中, ApoE 通过转运作用调控类固醇类激素的合成。鱼类的生殖方式大多数为体外受精, 其成熟卵子中富含由脂类构成的卵黄颗粒。对大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*)的研究表明, ApoE 基因在卵黄颗粒中高表达, 并在卵黄颗粒的形成和运输中起重要作用<sup>[4-5]</sup>。Durliat 等<sup>[6]</sup>克隆了斑马鱼 (*Danio rerio*) ApoE 基因, 经比对发现鱼类 ApoE 基因和其它脊椎动物的基因序列较保守<sup>[6]</sup>。由此可推测, 鱼类 ApoE 在结构和功能上与哺乳类基本一致。目前关于鱼类 ApoE 基因的研究还较少, 除斑马鱼<sup>[6]</sup>、中华鲟 (*Acipenser sinensis*)<sup>[7]</sup>、朴丽鱼 (*Haplochromis mylodon*)<sup>[8]</sup>、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)<sup>[9]</sup>和大菱鲂外还未见有报道。

湖南师范大学鱼类发育生物学实验室与其协作单位湘阴县东湖渔场在红鲫 (*Carassius auratus red var.*)和湘江野鲤 (*Cyprinus carpio*)的杂交后代中成功选育出两性可育的异源四倍体鲫鲤群体 ( $4n=200$ ), 该四倍体群体已经连续繁殖了 19 代 ( $F_3 \sim F_{21}$ )<sup>[10]</sup>。该类群是世界上首次培育成功的两性可育异源四倍体鱼。利用雄性四倍体鲫鲤与雌性二倍体鲫或者鲤杂交可获得生长快速、抗逆性强且不育的三倍体鲫(鲤)。目前这些三倍体鱼在全国范围内已推广, 产生了显著的经济效益和社会效益<sup>[11]</sup>。同时, 异源四倍体鲫鲤也是研究鱼类多倍化的重要模型。在长期的演化过程中, 鱼类形成了染色体数目成倍变化的不同种群。有学者提出这些染色体数目成倍性变化的鱼类可能是通过远缘杂交形成的, 异源四倍体鲫鲤的诞生为这一学说提供了有力的证据<sup>[12-14]</sup>。目前为止, 虽然本实验室对异源四倍体鲫鲤已经进行了较为系统的研究, 但对胆固醇代谢的相关基因尚未进行过研究。本研究分离

收稿日期: 2011-09-11 修回日期: 2011-12-15

资助项目: 国家杰出青年科学基金项目(30725028); 湖南省自然科学创新研究群体基金项目(10JJ7004); 国家公益性行业科研专项资金项目(200903046); 湖南省重点学科建设项目

作者简介: 王凤华, 周毅为同等贡献作者

通讯作者: 刘少军, E-mail: lsj@hunnu.edu.cn

和克隆了异源四倍体鲫鲤及其原始亲本 ApoE 的 cDNA 序列, 比较了异源四倍体鲫鲤该基因与其父母本的变化, 并探讨了 ApoE 在 3 种鱼成体中不同组织的表达模式, 为研究异源四倍体鲫鲤胆固醇代谢、性腺发育机制及演化特征提供了基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验鱼均来自于湖南师范大学多倍体鱼繁殖与育种技术教育部工程研究中心。随机取健康的异源四倍体鲫鲤(第 19 代 F<sub>21</sub>)、红鲫、鲤个体各组织用于 RNA 提取。

实验所用试剂: 0.1% DEPC(焦炭酸二乙酯, 上海生工)、Trizol 裂解液(英韦创津)、氯仿、第一链 cDNA 合成试剂盒(Fermentas)、Taq 酶(Fermentas), 胶回收试剂盒(上海生工), pMD18-T 载体(TAKARA), Smart Race 试剂盒(Clontech)。

### 1.2 RNA 提取

鱼解剖后用手术剪取得肝脏组织并立即冷冻于液氮中。材料马上进行总 RNA 提取, 剩余材料放入-80 °C 冰箱保存。RNA 采用异硫氰酸胍裂解法, 按照供应商提供说明书进行提取。提取好的 RNA 用琼脂糖凝胶电泳检测, 以 28S rRNA 和 18S rRNA 检测所提取的总 RNA 完整性, 并用分光光度计测定 RNA 的浓度。

### 1.3 第一链 cDNA 合成

取 2 μg 肝脏总 RNA, 加入 1 μL Oligo (dT)<sub>17</sub> 后用 RNase free H<sub>2</sub>O 定容到 12 μL, 65 °C 变性 5 min 后冰上冷却 2 min。在反应液中加入 5×Buffer 4 μL, 10 mol/L dNTP 2 μL, 1 μL RNase Inhibitor 和 1 μL AMV 酶后混匀, 离心。42 °C 孵育 60 min, 70 °C 5 min 终止反应, 于-20 °C 贮存备用。

### 1.4 ApoE 基因部分序列扩增及测序

根据 GenBank 中已经发布的硬骨鱼类的 cDNA 序列进行 Clustalw 比对, 并设计简并引物: 正向引物为 5'-ATGCWTCTGATGCTGCTGG-3', 反向引物为 5'-CGTAGGTTYTCGGCKGTCTB-3', 其中简并碱基 W 为 A/T, Y 为 C/T, K 为 G/T, B 为 C/G/T。PCR 扩增反应程序为 94 °C 预变性 5 min 后进入 30 个循环, 循环条件为 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 最终 72 °C 延伸 5 min。反应完成后取 5 μL 反应产物于 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。手术刀切下目的片段, 胶回收试剂盒纯

化后, pMD18-T 载体连接转化。PCR 检测克隆后送上海生工测序。

### 1.5 3'和 5'端扩增及测序

Apolipoprotein E 基因 3'和 5'端扩增均采用 Clontech 公司提供的 Smart Race 试剂盒进行。3'和 5'Race 按照试剂盒说明书均采用嵌套式 PCR 进行。3'Race 的特异引物为两条正向引物: 3'Race 内测引物 CGCAGGAGATGAGCGAACAG 和 3'Race 外侧引物 TGGAGCAGACCGCCGAAAA。第一次 PCR 反应过程为 94 °C 预变性 5 min 后进入 30 个循环, 循环条件为 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 最终 72 °C 延伸 5 min。第二次 PCR 除退火温度改为 58 °C 外, 其它条件均如第一次 PCR。扩增产物回收后克隆测序。5'Race 的特异引物为两条反向引物: 5'Race 内测引物 CGTTCCT-TAGCGTCAGTCAT, 5'Race 外侧引物 GGTGC-CGACACGGTTCTT。两次扩增条件均为 94 °C 预变性 5 min 后进入 30 个循环, 循环条件为 94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 最终 72 °C 延伸 5 min。扩增产物回收克隆后送上海生工测序。

### 1.6 序列分析

将获得的 ApoE 基因序列通过 DNAMAN 软件进行翻译, 得到异源四倍体鲫鲤、红鲫和鲤 ApoE 的氨基酸序列。通过 NCBI 的 Blastp 获得 12 种近缘的脊椎动物序列: 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)NP\_001117818, 石鲈 (*Oplegnathus fasciatus*)ACF21982, 金鲈 (*Perca flavescens*)ACO36146, 斑马鱼 AAI54035, 中华鲟 ACV96856, 非洲爪蟾 (*Xenopus tropicalis*)AAH62519, 大鼠 (*Rattus norvegicus*)NP\_620183, 牛 (*Bos taurus*)NP\_776416, 人 (*Homo sapiens*)AAB59397。并通过 Clustalw 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 进行多序列比对分析。最后, 通过 MEGA 4.1 软件构建邻接(Neighbour-Joining, NJ)进化树, 并采用 1000 次 Bootstrap 重复检验进化树的置信度<sup>[15]</sup>。

### 1.7 组织表达分析

分别选取已达性成熟的异源四倍体鲫鲤、红鲫和鲤的脑、垂体、心脏、肝脏、脾脏、精巢和卵巢这 7 个组织。提取组织总 RNA 后, 根据已获得的序列设计 real-time PCR 引物: 正向引物为 AGCCTCCTCACCCCTTACTCTG, 反向引物为 GTTTGGTGTAACTCTAGA。并以 β-actin 为内参, 引物为正向 GCCCTGCCCATGCCAT CCT, 反向 AGTGCCCATCTCCTGCTCGA。使用 ABI 7500 实

时定量 PCR 仪, PCR 反应总体积为 20  $\mu$ L: 正反向引物浓度为 20 nmol/L, SYBR Green PCR Master Mix(ABI)10  $\mu$ L, cDNA 模板 5  $\mu$ L, 无菌水定容到 20  $\mu$ L。反应条件为 50  $^{\circ}$ C, 2 min; 95  $^{\circ}$ C, 10 min; 95  $^{\circ}$ C, 15 s, 61  $^{\circ}$ C, 45 s, 40 个循环。每个样重复 3 个平行孔。参照 Livark 等<sup>[16]</sup>提出的相对标准曲线法  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 对相对定量的结果进行分析, 得到不同倍性鱼的相对表达量并做图。最后用熔解曲线法来检测实时定量 PCR 的产物。

## 2 结果

### 2.1 异源四倍体鲫鲤及其亲本 ApoE 基因的分离

根据 GenBank 中已经发表的硬骨鱼类 ApoE 基因的保守核苷酸序列合成简并引物, 并以异源

四倍体鲫鲤及其亲本的肝脏 cDNA 进行扩增, 均获得约 450 bp 左右的核心片段。通过 NCBI 的 Blastn 分析可知,450 bp 左右的片段为硬骨鱼类的 ApoE 基因同源片段。对异源四倍体鲫鲤及其亲本 ApoE 基因进行 3'-Race 和 5'-Race 产物测序, 分别获得 650 bp 和 450 bp 的片段。通过拼接获得 3 种鱼 ApoE 基因全长。其中异源四倍体鲫鲤 ApoE 基因 cDNA(GenBank 登录号: JN595807)全长为 1393 bp (图 1), 红鲫 ApoE 基因 cDNA (GenBank 登录号: JN595808)全长为 1384 bp (图 2), 鲤 ApoE 基因 cDNA(GenBank 登录号: JN595809)全长为 1396 bp (图 3)。3 种鱼的开放阅读框均为 846 bp, 编码 281 个氨基酸。

```

1      CACGGAGAAAATTACACGTCTCAGGTGTAAGTCTCTTGT
1      M K S L V
61     GGTGATCTTTGCTCTGGCTGTTTTTACTGGCTGCCAGGCTCGTAGCCTGTTCCAGGCTGA
6      V I F A L A V F T G C Q A R S L F Q A D
121    TGCCCTCAGCCCAGATGGGAGGAGATGGTGGACCGCTTCTGGCAGTATGTGTCCGAGCT
26     A P Q P R W E E M V D R F W Q Y V S E L
181    CAACACACATGCTGACGGTGTGGTGGAAACATCAAGGGCTCCAGCTCAGCAGAGAGCT
46     N T H A D G V V E N I K G S Q L S R E L
241    TGACACCCTGATTAGTGACACCATGGCTGAGCTGAGCACATACAGTGACAATCTTCAAAC
66     D T L I S D T M A E L S T Y S D N L Q T
301    CCAGCTGACTCCATATGCTTCTGATGCTGCTGGTCCAGCTGAACAAAGATCTCCAGCTCTT
86     Q L T P Y A S D A A G Q L N K D L Q L L
361    GGCTAGCAAACCTGCAAACCTGACATGACCGATGCTAAGGAACGCTCCACTAAGTATCTGCA
106    A S K L Q T D M T D A K E R S T K Y L Q
421    AGAGCTGAAGACCATGATGGAGCAGAACCGCTGAAGACGTGAAGAACCAGCTCAGCACCTA
126    E L K T M M E Q N A E D V K N R V S T Y
481    CACCCGCAAACCTGAAGAAACCGCTGAACAAGGACACCGAGGAGATACGCAACACTGTGCA
146    T R K L K K R L N K D T E E I R N T V Q
541    AACATACTTGGGTGAGCTGCAAGTCTCGTCTCCCAAATGCTGAAGCCGTGAAGGACCG
166    T Y L G E L Q S R A S Q N A E A V K D R
601    TTTCGAGCCCTACGTCAACAGGCCCAATGTTGGTCCAGCCAGAAATGGGTGCCATTAG
186    F E P Y V N Q A H N G A S Q K L G A I S
661    CGAGCTGATGAAGTCTCAGGCGCAGGAGATGAGCAAGCAGTTGGAAGTCCAGGCTGGAGC
206    E L M K S Q A Q E M S K Q L E V Q A G A
721    TCTGAAGGAAAACCTGGAGCAGACCGCCGAAAACCTGCGCACATCCCTAGAGGGCCACAT
226    L K E N L E Q T A E N L R T S L E G H M
781    GGATGAACCTGACCCCTCCTCAGCCCTTACTCTGAGAAGATCCGTGAGCAGCTGCAGAT
246    D E L T S L L T P Y S E K I R E Q L Q I
841    CGTCATGGACAAGATCAAGGAGGCATCAGCAGCTCTCCCACTCAAGCTTAAGAGCTCCA
266    V M D K I K E A S A A L P T Q A *
901    CACTTATCTAGAGTTAACACCAAACAGAAACAAGAAAGGAGGTTTTGTGTTACTGAAATG
961    TGCTTTTTTTCATTCTGTGAGAGGTTGATAAGTGGTTAAGAACTGGACTCGACTGGACTAG
1021   CACTGTCCATTATTGGACAAAAGAATACCATGTAAGTCCACTGTTACTTTCTCAGTATT
1081   AACCCACTGTCTGAGGATATACTTTTAGTGTCTTTCGTTAGCATAACAGTAAAGAATTTTT
1141   AAGATCAATCAACTGCCTGTATTGGCAGTTATCTAAGAATGTTTTGTAGTTAGTGGGGC
1201   CAAAATGACACCATCAAAATAAATGTTAAAAAAGTGCCCTCAGCTGCTGAACCTAATCA
1261   GAATATATGTAAGATGAGCTTAGTTAGCCATAAATCCACATATACATGCTTGTTTACTT
1321   TATGTGTTTGTGCACTCTTGAATTTGAATTTGTTTTCAATAAATTTGTGTCTTTATACAC
1381   AAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 异源四倍体鲫鲤 ApoE 基因的 cDNA 全长核苷酸序列以及氨基酸序列  
Fig. 1 ApoE gene nucleotide and amino acid sequence of allotetraploid

```

1      GACACGGAGAACTCACGTTTTAAGGTGTTCTTGTCTGCCCATCAAATGAAGTCTCTTG
1      M K S L
61     TGGAATCTTTGCTCTGGCTGTTTTTACTGGCTGCCAGGCTCGTAGCTTGTTCAGGCTG
5      V V I F A L A V F T G C Q A R S L F Q A
121    ATGCCCTCAGCCAGATGGGAGGAGATGGTGGACCGCTTCTGGCAGTCCGTGTCCGAAC
25     D A P Q P R W E E M V D R F W Q S V S E
181    TCAACACACATGCTGATGGTGTACTGCAGAACATCAAGGGCTCCCAGCTCAACAGAGAGC
45     L N T H A D G V L Q N I K G S Q L N R E
241    TTGACACCCTGATTAGTGAGACCATGACTGAGCTGAGCACATACAGTGACAACCTTCAA
65     L D T L I S E T M T E L S T Y S D N L Q
301    CCCAGTGACTCCATATGCTTCTGATGCTGCCGGTCAGCTGAACAAAGATCTCCAGCTCT
85     T Q L T P Y A S D A A G Q L N K D L Q L
361    TGGCTAGCAAACCTGCAAACCTGACATGACTGACGCTAAGGAACGCACCACCCAGTACCTCC
105    L A S K L Q T D M T D A K E R T T Q Y L
421    AAGAGCTGAAGACCATGATGGAGCAGAACAGTGAAGACGTGAAGAACCGTGTGACACCT
125    Q E L K T M M E Q N S E D V K N R V S T
481    ACACCCGCAAACCTGAAGAAACGCCTGAACAAGGACACCGAGGAGATCCGCAATACTGTGG
145    Y T R K L K K R L N K D T E E I R N T V
541    AACCTACATGGGAGAGCTGCAGTCTCGCGCTTCCCAAATGCTGAAGCCGCGAAGGACC
165    E T Y M G E L Q S R A S Q N A E A A K D
601    GTTTCGAGCCCTACGTCAACCAGGCCAGAGTGGTACCGGCGAGAAATTGGGGCCATTA
185    R F E P Y V N Q A Q S G T G E K L G A I
661    GCGAACTGATGAAGTCCCAGGCGCAGGAGATGAGCGAACAGTTGGAAGTCCAGGCTGGAG
205    S E L M K S Q A Q E M S E Q L E V Q A G
721    CTTTGAAGGAGAAGCTGGAGAAGACCGCGAGGACCTGCGCACATCCCTAGAGGGTCTGT
225    A L K E K L E K T A E D L R T S L E G R
781    TGGATGAGCTGACCAGCCTCCTCACCCTTACTCTGAGAAGATCCGTGAGCAGCTGCAGA
245    V D E L T S L L T P Y S E K I R E Q L Q
841    TCGTCATGGACAAGATCAAGGAGCCTCAGCAGCTCTTCCCGCTCAGGCTTAAGAGCTCC
264    I V M D K I K E A S A A L P A Q A *
901    ACACTTATCTAGAGTTAACACCAAACGCAAACAAGAAGGGAGGTTTTGTGTTACTGAAAT
961    GTGTGTTTTTTTTCATTCTGTGAGAGGTTGATAAGTGGTTAAGAAGTGGACTCAACTGGAC
1021   TAGCACTGTCCATCATTGGACAAGAGAATACCATGTACTCACCATGTTATTAACCCACTG
1081   TCTGTTGATATCATTTTAGTGTCTTTCGTTAGCATAACAGTAAGCATTTTTCAGATCAAC
1141   TTGCCTGTTTTGGCAGTTATCTAAAAGTGTGTTTGTAGTTAGTGGGGCTAACATTGCGACA
1201   TTCAAAATAAACGTTAAAAAGTGCCCTTCAAGCTGCTGAACTTAATCAGAATATATGTAAG
1261   GATGAGCTTAGTTAGCCATAAATCCACATATACATGCTTGTGTTACTTTATGTGTTTGTGC
1321   ACTCTTGATTTGAATTTGTTTTCAATAAATTTGTGTCTTTATACACTAAAAAAAAAAAA
1381   AAAA

```

图 2 红鲫 ApoE 基因的 cDNA 全长核苷酸序列以及氨基酸序列  
 Fig. 2 ApoE gene nucleotide and amino acid sequence of red crucian carp

2.2 序列分析

采用 DNAMAN 软件将 3 种鱼的 ApoE 基因进行翻译, 得到编码的氨基酸序列, 并进行 Clustalw 比对(图 5), 从氨基酸水平来看, 在异源四倍体鲫鲤、红鲫和鲤 ApoE 中共有 23 个可变位点。在这些可变位点中异源四倍体鲫鲤有 21 个位点与父本鲤一致, 仅有 2 个位点既不同于父本也不同于母本(图 5)。

异源四倍体鲫鲤 ApoE 的结构式为 C<sub>1370</sub>H<sub>2224</sub>N<sub>386</sub>O<sub>453</sub>S<sub>11</sub>, 其分子量为 31.7 ku, 等电点为 5.15。从氨基酸组成看 Leu 含量最高共 33 个占 11.7%。平均亲水性指数(Grand average of hydropathicity, GRAVY)为-0.626, 属亲水性蛋白。

红鲫 ApoE 的结构式为 C<sub>1364</sub>H<sub>2225</sub>N<sub>383</sub>O<sub>458</sub>S<sub>11</sub>, 分子量为 31.7 ku, 其等电点为 4.92。从氨基酸组成看 Leu 含量最高共 33 个占 11.7%。平均亲水性指数为-0.655, 属亲水性蛋白。

鲤 ApoE 的结构式为 C<sub>1368</sub>H<sub>2222</sub>N<sub>384</sub>O<sub>454</sub>S<sub>12</sub>, 分子量为 31.7 ku, 其等电点为 5.00。从氨基酸组成看 Leu 含量最高共 33 个占 11.7%。平均亲水性指数为-0.607, 属亲水性蛋白。

2.3 ApoE 的系统进化分析

对比 12 个物种的氨基酸序列发现, 异源四倍体鲫鲤 ApoE 与父本鲤的相似性最高, 达到 99.3%。其次是红鲫, 91.5%。相较于硬骨鱼类的其它类群, 鲤科鱼类的 ApoE 比较保守, 其相似率在 84.7%~

```

1      ACACGGAGAAAATTTACGCGTCTCAGGTGTACTTGTCTGCCCATCAAATGAAGTCTCTT
1      M K S L
61     GTGGTGATCTTTGCTCTGGCTGTTTTACTGGCTGCCAGGCTCGTAGCCTGTTCCAGGCT
5      V V I F A L A V F T G C Q A R S L F Q A
121    GATGCCCTCAGCCCAGATGGGAGGAGATGGTGGACCGCTTCTGGCAGTATGTGTCCGAG
25     D A P Q P R W E E M V D R F W Q Y V S E
181    CTCAACACACATGCTGACGGTGTGGTGGAGAACATCAAGGGCTCCCAGCTCAGCAGAGAG
45     L N T H A D G V V E N I K G S Q L S R E
241    CTTGACACCCTGATTAGTGACACCATGGCTGAGCTGAGCACATACAGTGACAACTTTCAA
65     L D T L I S D T M A E L S T Y S D N L Q
301    ACCCAGCTGACTCCATATGCTTCTGATGCTGCTGAGCTGAACAAAGATCTCCAGCTC
85     T Q L T P Y A S D A A G Q L N K D L Q L
361    TTGGCTAGCAAACCTGCAAACCTGACATGACCGATGCTAAGGAACGCTCCACTATGTATCTG
105    L A S K L Q T D M T D A K E R S T M Y L
421    CAAGAGCTGAAGACCATGATGGAGCAGAACCGTGAAGACGTGAAGAACCGCGTCAGCACC
125    Q E L K T M M E Q N A E D V K N R V S T
481    TACACCCGCAAACCTGAAGAAACGCCTGAACAAGGACACCGAGGAGATACGCAACACTGTG
145    Y T R K L K K R L N K D T E E I R N T V
541    CAAACATACTTGGGTGAGCTGCAGTCTCGTGCTTCCCAAATGCTGAAGCCGTGAAGGAC
165    Q T Y L G E L Q S R A S Q N A E A V K D
601    CGTTTCGAGCCCTACGTCAACCGCCAGAATGGTGCCAGCCAGAAATGGGTGCCATT
184    R F E P Y V N Q A Q N G A S Q K L G A I
661    AGCGAGCTGATGAAGTCTCAGGCGCAGGAGATGAGCAAGCAGTTGGAAGTCCAGGCTGGA
205    S E L M K S Q A Q E M S K Q L E V Q A G
721    GCTCTGAAGGAAAACCTGGAGCAGACCGCCGAAAACCTGCGCACATCCCTAGAGGGCCAC
225    A L K E N L E Q T A E N L R T S L E G H
781    ATGGATGAACTGACCAGCCTCCTCACCCCTTACTCTGAGAAGATCCGTGAGCAGCTGCAG
245    M D E L T S L L T P Y S E K I R E Q L Q
841    ATCGTCATGGACAAGATCAAGGAGGCATCAGCAGCTCTTCCCACTCAAGCTTAAGAGCTC
265    I V M D K I K E A S A A L P T Q A *
901    CACACTTATCTAGAGTTAACACCAACAGAAACAAGAAGGAGGTTTTGTGTACTGAAA
961    TGTGCTTTTTTTCATTCTGTGAGAGGTTGATAAGTGGTTAAGAAGTGGACTCGACTGGACT
1021   AGCACTGTCCATTATTGGACAAAAGAATACCATGTACTCACCATGTTTACTTTCTCAGTA
1081   TTAACCCACTGTCTGAGGATATACTTTTAGTGTCTTTTCGTTAGCATAACAGTAAAGAAATTT
1141   TTAAGATCAATCAACTTGCCTGTATTGGCAGTTATCTAAGAATGTTTTGTAGTTAGTGGG
1201   GCCAAAATGACACCATTCAAATAAATGTTAAAAAAGTGCCTTCAGCTGCTGACCTAAAT
1261   CAGAATATATGTAAAGATGAGCTTTGTTAGCCACAAATCCACATATAAATGCTTGTTTAC
1321   TTTATGTGTTTGTGTGCTGTTGTATTGAAATTTGTTTTCAATAAATGTGTGCTCTACTAC
1381   ACAAAAAAAAAAAAAA

```

图3 鲤 ApoE 基因的 cDNA 全长核苷酸序列以及氨基酸序列  
 Fig. 3 ApoE gene nucleotide and amino acid sequence of common carp

99.3%(表 1)。而与其它鱼类比,相似度较低,如鲤科鱼类与鲈形目的相似率在 57.4%~66.3%。与鲟则差异更大,为 41.6%~43.4%。鲤科鱼类与两栖类和哺乳类的差异最大在 27.0%~29.2%。

基于获得的 ApoE 序列和从 GenBank 获得的 9 个物种 ApoE 的氨基酸序列,利用 MEGA 4.1 软件构建 NJ 进化树,所有分支均采用 Bootstrap 1000 次检验置信度,系统进化树也同样证实异源四倍体鲤与其父本鲤有更高的相似率,类聚为一枝,而与母本红鲫差异稍大。从该进化树可看出,异源四倍体鲤与其双亲聚为一枝,而鱼类作为一个大类群聚为一枝。该系统进化树与传统分类学相吻合(图 4)。

### 2.4 ApoE 在不同组织的表达

Real-time PCR 检测 ApoE 基因在 3 种鱼不同组织的表达,结果表明,ApoE 基因在 3 种鱼的所有组织均有表达,在脾脏中表达量最高,其次是肝脏和卵巢(图 6)。

### 3 讨论

血浆中的胆固醇浓度与性腺发育、类固醇调节作用、体内脂肪代谢都有重要关系。而目前对鱼类胆固醇及脂类代谢的相关研究在国内还较少。ApoE 基因在人类中已经得到了广泛研究,在胆固醇代谢和心血管疾病发生中起重要作用<sup>[1-3]</sup>。

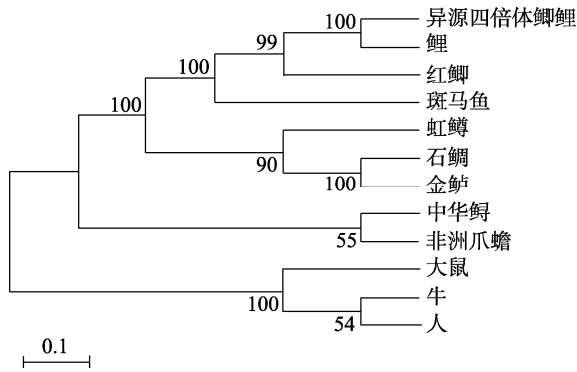


图 4 12 种脊椎动物 ApoE 基因的 NJ 系统进化树

虹鳟: NP\_001117818, 石鲮: ACF21982, 金鲈: ACO36146, 斑马鱼: AA154035, 中华鲟: ACV96856, 非洲爪蟾: AAH62519, 大鼠: NP\_620183, 牛: NP\_776416, 人: AAB59397

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the ApoE amino acid sequences alignment of twelve vertebrates

*Oncorhynchus mykiss*: NP\_001117818, *Oplegnathus fasciatus*: ACF21982, *Perca flavescens*: ACO36146, *Danio rerio*: AA154035, *Acipenser sinensis*: ACV96856, *Xenopus tropicalis*: AAH62519, *Rattus norvegicus*: NP\_620183, *Bos taurus*: NP\_776416, *Homo sapiens*: AAB59397

通过对比异源四倍体鲫鲤及其亲本的 ApoE 基因的氨基酸序列可以发现, 异源四倍体鲫鲤的 ApoE 基因与鲤相似性更高, 也就是说异源四倍体鲫鲤 ApoE 基因与其父本相似性较高。3 种鱼对比后共有 23 个氨基酸差异位点。其中异源四倍体鲫鲤与红鲫有 23 个不同位点, 异源四倍体鲫鲤与鲤则仅有 2 个氨基酸差异位点。以前的研究证实

异源四倍体不仅在 mtDNA 中<sup>[19]</sup>, 而且在基因组 DNA 异源四倍体鲫鲤都呈现偏母本的特征。例如, RAPD<sup>[20]</sup>和 Sox9a<sup>[21]</sup>的研究结果都表明在基因序列上往往与母本红鲫更相似, 本研究表明在异源四倍体鲫鲤中 ApoE 基因与父本的序列更为相似。

另外, 有 2 个位点在 3 种鱼中各不相同。这说明异源四倍体在同时遗传了父母本的 ApoE 基因组序列后还产生了新的变异。异源四倍体鲫鲤是经过远缘杂交形成, 并经过多代的繁育, 至今已繁殖至第 19 代, 因此在进化过程中发生了变异。远缘杂交为物种基因组提供了新的进化动力, 杂交形成了的新群, 其基因组往往呈现出更不稳定和更多的可塑性<sup>[22]</sup>。在外界环境的自然选择作用中, 往往出现更多的适应性变异。在 RAPD 和 Sox 基因片段的研究中, 异源四倍体鲫鲤也表现了在远缘杂交和多代繁育后的变异特征, 这种变异可能是远缘多倍化产生新物种的驱动力之一。

系统进化表明, 异源四倍体鲫鲤、红鲫和鲤的 ApoE 与同属于鲤科斑马鱼的相似性最高, 而与其它目的虹鳟、石鲮、金鲈以及中华鲟相似性则较低。与非洲爪蟾和大鼠、牛、人等哺乳类动物相似性最低。同时, 采用 ApoE 氨基酸序列构建的系统进化树与传统分类的进化关系也相一致, 证明在系统进化中 ApoE 基因在鱼类中保持着高度保守的进化特征。

表 1 12 种脊椎动物氨基酸序列相似度(上三角)和分离度(下三角)

Tab. 1 Identification (upper triangle) and divergence (lower triangle) rate of twelve vertebrates

|    | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12   |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 1  |       | 91.5  | 99.3  | 65.1  | 66.3  | 60.6  | 86.1  | 43.4  | 30.9  | 27.4  | 28.8  | 28.8 |
| 2  | 0.088 |       | 91.8  | 61.1  | 63.8  | 57.8  | 84.7  | 41.6  | 31.3  | 27.8  | 28.8  | 29.9 |
| 3  | 0.007 | 0.084 |       | 64.7  | 66.3  | 60.6  | 86.5  | 43.4  | 30.9  | 27.4  | 29.2  | 28.8 |
| 4  | 0.424 | 0.488 | 0.430 |       | 70.9  | 64.4  | 64.7  | 44.5  | 30.9  | 27.3  | 26.5  | 28   |
| 5  | 0.407 | 0.447 | 0.407 | 0.348 |       | 81.9  | 64.5  | 43.4  | 29.5  | 26.4  | 24.3  | 27.9 |
| 6  | 0.482 | 0.531 | 0.482 | 0.430 | 0.181 |       | 57.4  | 43.1  | 28    | 29.6  | 22    | 29.2 |
| 7  | 0.155 | 0.168 | 0.150 | 0.430 | 0.435 | 0.537 |       | 41.6  | 30.9  | 27    | 28.8  | 28.5 |
| 8  | 0.835 | 0.878 | 0.835 | 0.802 | 0.827 | 0.835 | 0.878 |       | 39.1  | 28.5  | 27.4  | 29.2 |
| 9  | 1.175 | 1.163 | 1.175 | 1.163 | 1.211 | 1.262 | 1.175 | 0.933 |       | 26.9  | 26.2  | 26.5 |
| 10 | 1.262 | 1.236 | 1.262 | 1.275 | 1.343 | 1.236 | 1.275 | 1.262 | 1.401 |       | 64.7  | 70.5 |
| 11 | 1.236 | 1.224 | 1.224 | 1.302 | 1.416 | 1.401 | 1.236 | 1.302 | 1.329 | 0.348 |       | 72.2 |
| 12 | 1.211 | 1.199 | 1.211 | 1.275 | 1.329 | 1.302 | 1.224 | 1.275 | 1.386 | 0.278 | 0.278 |      |

注: 1: 异源四倍体鲫鲤, 2: 红鲫, 3: 鲤, 4: 虹鳟, 5: 石鲮, 6: 金鲈, 7: 斑马鱼, 8: 中华鲟, 9: 非洲爪蟾, 10: 大鼠, 11: 牛, 12: 人。

Notes: 1: allotetraploid, 2: red crucian carp, 3: common carp, 4: *O. mykiss*, 5: *Oplegnathus fasciatus*, 6: *P. flavescens*, 7: *D. rerio*, 8: *A. sinensis*, 9: *X. tropicalis*, 10: *R. norvegicus*, 11: *B. taurus*, 12: *H. sapiens*.

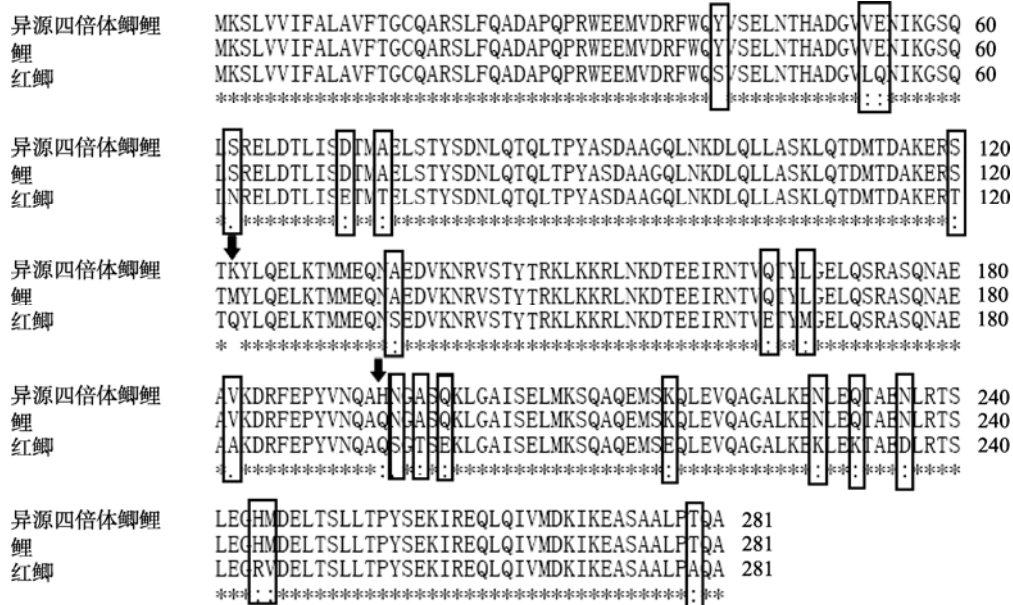


图 5 异源四倍体鲫鲤与其父母本 ApoE 氨基酸序列比对

框表示异源四倍体仅与母本有差异的氨基酸,黑色箭头示与父母本均有差异的氨基酸

Fig. 5 Alignment of allotetraploid and parental ApoE amino acid sequences

The differential sites between allotetraploid and red crucian carp were boxed. Grey arrow showed the differential sites between allotetraploid and common carp. Black arrow showed the different site among the three fishes

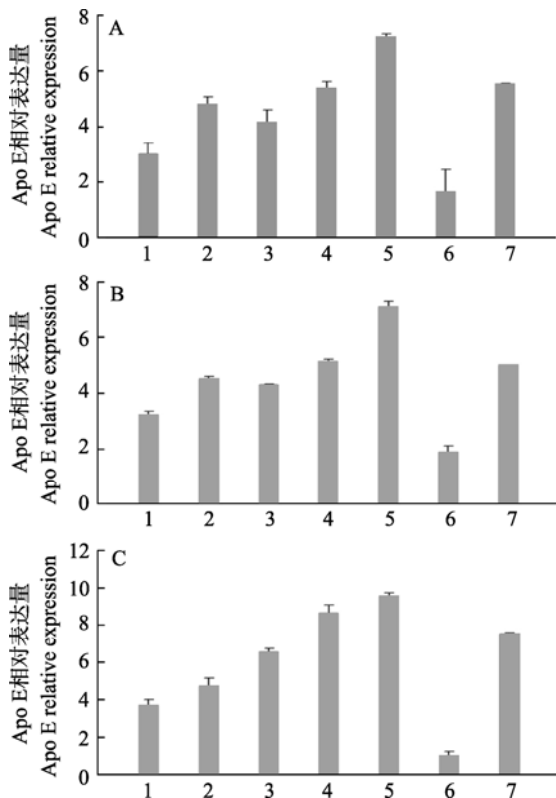


图 6 异源四倍体鲫鲤(A)、红鲫(B)和鲤 (C)ApoE 基因的组织表达

1: 脑, 2: 垂体, 3: 心脏, 4: 肝脏, 5: 脾脏, 6: 精巢, 7: 卵巢。

Fig. 6 Tissues expression of allotetraploid, red crucian carp and common carp

1. Brain, 2. Pituitary, 3. Heart, 4. Liver, 5. Spleen, 6. Testis, 7. Ovary.

本研究发现 ApoE 基因在 3 种鱼中的组织表达模式基本一致,均在脾脏中表达量最高,其次是在肝脏和卵巢。肝脏作为脂类代谢器官有着较高表达则在意料之中。脾脏作为主要免疫器官,其高含量的 ApoE 表达原因并不清楚。另外,卵巢由于是卵黄生成的主要部位,也具有较高的 ApoE 表达。值得注意的是在神经系统中, ApoE 也有表达,提示它可能参与脑中的脂代谢过程,这与其它鱼类的研究结果相类似。

本研究克隆了异源四倍体鲫鲤、红鲫和鲤的 ApoE 基因全长序列并进行了系统进化分析。3 种鱼的 ApoE 基因高度保守,但异源四倍体鲫鲤在氨基酸序列上出现了新的变异。本研究为进一步探讨 ApoE 基因在鱼类的脂类代谢、生殖调控和免疫机制中的作用以及在异源多倍化的进化方式提供了信息。

参考文献:

[1] Nakashima Y, Plump A, Raines E, *et al.* Apoe-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1994, 14(1): 133-140.

[2] Schachter F, Faure-Delanef L, Guenot F, *et al.* Genetic associations with human longevity at the apoe and ace loci [J]. *Nature Genetics*, 1994, 6(1): 29-32.

- [3] Meyer M R, Tschanz J T, Norton M C, *et al.* Apoe genotype predicts when-not whether-one is predisposed to develop alzheimer disease [J]. *Nature Genetics*, 1998, 19(4): 321–322.
- [4] Poupard G, André M, Durliat M, *et al.* Apolipoprotein e gene expression correlates with endogenous lipid nutrition and yolk syncytial layer lipoprotein synthesis during fish development [J]. *Cell and Tissue Research*, 2000, 300(2): 251–261.
- [5] van Nas A, Guhathakurta D, Wang S S, *et al.* Elucidating the role of gonadal hormones in sexually dimorphic gene coexpression networks [J]. *Endocrinology*, 2009, 150(3): 1235–1249.
- [6] Durliat M, André M, Babin P J. Conserved protein motifs and structural organization of a fish gene homologous to mammalian apolipoproteine [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(2): 549–559.
- [7] Li C J, Gan F, Chen X H, *et al.* Molecular and expression analysis of apolipoprotein e gene in the chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 158(1): 64–70.
- [8] Chen S L, Xu M Y, Hu S N, *et al.* Analysis of immune-relevant genes expressed in red sea bream (*Chrysophrys major*) spleen [J]. *Aquaculture*, 2004, 240(1–4): 115–130.
- [9] Kondo H, Morinaga K, Misaki R, *et al.* Characterization of the pufferfish *Takifugu rubripes* apolipoprotein multigene family [J]. *Gene*, 2005, 346: 257–266.
- [10] Liu S, Liu Y, Zhou G, *et al.* The formation of tetraploid stocks of red crucian carp×common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization [J]. *Aquaculture*, 2001, 192(2–4): 171–186.
- [11] Shen J M, Liu S J, Sun Y D, *et al.* A new type of triploid crucian carp—red crucian carp (♀)×allotetraploid (♂) [J]. *Progress in Natural Science*, 2006, 16(12): 1348–1352.
- [12] Ohno S. Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970–1999 [J]. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 1999, 10: 517–522.
- [13] Ye Y, Zhou J, Wang X, *et al.* Reproduction mode of an artificial allotetraploid carp (pisces; cyprinidae) [J]. *Hereditas*, 2002, 137(2): 140–144.
- [14] Zhu H P, Gui J F. Identification of genome organization in the unusual allotetraploid form of *Carassius auratus gibelio*[J]. *Aquaculture*, 2007, 265(1–4): 109–117.
- [15] Kumar S, Nei M, Dudley J, *et al.* Mega: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2008, 9(4): 299–306.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. 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.
- [17] Mahley R W, Rall S C. Apolipoprotein e: Far more than a lipid transport protein [J]. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2000, 1(1): 507–537.
- [18] 刘群, 陈利军, 谭学瑞. ApoE 基因型与心脑血管病的前瞻性研究[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2009, 3: 139–143.
- [19] Guo X, Liu S, Liu Y. Evidence for maternal inheritance of mitochondrial DNA in allotetraploid [J]. *DNA Seq*, 2007, 18(4): 247–56.
- [20] Yan J, Liu S, Sun Y, *et al.* Rapd and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*)×common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Aquaculture*, 2005, 243(1–4): 49–60.
- [21] Liu J, Liu S, Tao M, *et al.* Analysis of intron sequence variability of the conservative hmg-box of sox9 genes in allotetraploids and their original parents [J]. *Progress in Natural Science*, 2007, 17(5): 537–543.
- [22] 刘少军, 曹运长, 何晓晓, 等. 异源四倍体鲫鲤群体的形成及四倍体化在脊椎动物进化中的作用[J]. *中国工程科学*, 2001(12): 33–41.



## Apolipoprotein E gene cloning and tissues expression analysis in allotetraploid and its parents

WANG Feng-hua<sup>#</sup>, ZHOU Yi<sup>#</sup>, LIU Shao-jun<sup>\*</sup>, ZHONG Huan, ZHANG Chun, TAO Min, LIU Yun

(Key Laboratory of Protein Chemistry and Fish Developmental Biology, Ministry of Education of China, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

**Abstract:** As a key factor in cholesterol metabolism, Apolipoprotein E is participate in lipoprotein transport and gonadal development. To understand function of ApoE, the cDNAs of allotetraploid and their parents-red crucian carp and common carp were cloned and sequenced. The full length of allotetraploid, red crucian carp and common carp ApoE cDNAs were 1393 bp, 1384 bp and 1396 bp, respectively. All the cDNAs encode 281 amino acids. Based on alignment result, ApoE of allotetraploid is more similar with common carp than red crucian carp. Meanwhile, besides characters inherited from parents, allotetraploid shows specific mutation in ApoE. By constructing phylogenetic tree using Mega software, the phylogenetic tree of ApoE was consistent with taxonomy: cyprinid fish are clustered together rather than other vertebrates. Realtime-PCR analysis indicated that the expression patterns of ApoE in allotetraploid, common carp and red crucian carp are similar. All the tissues had ApoE expression. The highest expression was in spleen. This research gave information in gene variation in the process of allotetraploid evolvement and lipid metabolic mechanism of fish.

**Key words:** allotetraploid; red crucian carp; common carp; Apolipoprotein E(ApoE); tissue expression

**Corresponding author:** LIU Shao-jun. E-mail: lsj@hunnu.edu.cn

WANG Feng-hua, ZHOU Yi contributed equally to this work.