

暗纹东方鲀心型脂肪酸结合蛋白 *H-FABP* 基因克隆与表达分析

廖玉英, 叶超霞, 尹嘉琪, 吴映霞, 王安利*

(华南师范大学生命科学学院, 广东省水产健康安全养殖重点实验室,
生态与环境科学广东普通高校重点实验室, 广东 广州 510631)

摘要: 为深入了解心型脂肪酸结合蛋白(heart-type fatty acid-binding protein, H-FABP)的结构与功能, 采用 RACE 技术克隆得到暗纹东方鲀 H-FABP 的全长 cDNA 序列, 共 772 bp, 开放阅读框为 402 bp, 编码 133 个氨基酸。生物信息学分析表明, 暗纹东方鲀 *H-FABP* 基因具有一个脂质转运蛋白家族保守结构域和多个蛋白激酶磷酸化位点。NJ 法系统进化分析显示, 暗纹东方鲀与红鳍东方鲀亲缘关系最近, 其次是鲈形目。经荧光定量 PCR 检测, *H-FABP* 基因在暗纹东方鲀所有被检测的组织中都有表达, 其中肝脏中的表达量最高, 其次为肌肉和心脏, 预示 H-FABP 主要参与脂肪酸氧化分解过程。为探究豆油作为脂肪源的可行性, 采用不同比例(0、25%、50%和 75%)豆油替代鱼油的饲料投喂初始体质量为(8.31 ± 0.20)g 的暗纹东方鲀 8 周。结果显示, 全鱼油组肝脏中 *H-FABP* 基因的表达量显著高于 50% 豆油组和 75% 豆油组, 但与 25% 豆油组无显著性差异, 且随着饲料中豆油比例的增加, 暗纹东方鲀肝脏中 *H-FABP* 基因的表达量呈下降趋势。研究表明, 富含 n-3 多不饱和脂肪酸的鱼油可以促进脂肪酸氧化分解, 能预防脂肪肝。因此, 为不影响暗纹东方鲀肝脏脂肪代谢, 饲料中豆油替代鱼油的比例应控制在 50% 以下。

关键词: 暗纹东方鲀; 心型脂肪酸结合蛋白; 克隆; 表达分析

中图分类号: Q 785; S 963

文献标志码: A

脂肪酸结合蛋白(fatty acid-binding protein, FABP)是一类分子量较小(14~15 ku)、对脂肪酸有高亲和力的可溶性蛋白质, 属于脂质结合蛋白超家族成员。FABP 广泛存在于脊椎动物和非脊椎动物的细胞质中, 其功能主要是参与细胞对脂肪酸的摄取^[1]、细胞内脂肪酸的运输^[2]以及信号转导^[3]。1972 年, Ockner 等^[4]在从事长链脂肪酸吸收的研究时, 首次发现了脂肪酸结合蛋白。随后科学家们陆续发现了多种不同的 FABP, 并根据最初分离的组织命名, 其中包括肝型(liver, L-FABP)、肠型(intestinal, I-FABP)、心型(heart, H-FABP)、脑型(brain, B-FABP)、表皮型(epidermal, E-FABP)、脂肪细胞型(adipocyte, A-

FABP)以及睾丸型(testicular, T-FABP)等。不同类型的 FABP 基因序列之间具有较高的同源性, 目前普遍认为它们是由一个鱼类和哺乳动物分化之前的共同的祖先进化而来^[5]。如今, 关于心型脂肪酸结合蛋白的研究最深入的是人类, 其次是家畜和家禽。临床研究表明, 心型脂肪酸结合蛋白在人类心脏疾病如急性心肌梗死的诊断与治疗中具有重要作用^[6-7]。在家畜和家禽的研究中发现, *H-FABP* 基因的表达量与肌肉脂肪含量密切相关, 可作为检测肉质的候选基因^[8-10]。鱼类的 *H-FABP* 基因最早于 1988 年在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的心脏克隆中得到^[5], 目前已在斑马鱼(*Danio rerio*)、鲤(*Cyprinus*

收稿日期:2014-04-28 修回日期:2014-10-02

资助项目:国家自然科学基金(31100296);广东省高等学校科技创新重点项目(CXZD1114);广东省自然科学基金重点项目(S2011020003256);广东省科技计划项目(2012B020307004)

通信作者:王安利, E-mail:wanganl@scnu.edu.cn

carpio)、齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*) 等少数鱼类中克隆到。林亚秋等^[11] 研究表明, *H-FABP* 基因表达量与鲤和齐口裂腹鱼的肌肉脂肪含量关系密切。

暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*), 属于硬骨鱼亚纲 (Pisces)、鲀形目 (Tetraodontiformes)、鲀科 (Tetraodontidae)、东方鲀属 (*Takifugu*)^[12], 肉质鲜嫩, 风味独特, 民间素有“不吃河豚不知鱼味, 吃河豚百味皆无”的说法, 是“长江三鲜”之一, 具有较高的经济价值。此外, 暗纹东方鲀的肝体比远大于其他鱼类, 当其他鱼的肝体比达到暗纹东方鲀肝体比的水平时, 已经造成脂肪肝, 严重影响鱼体健康, 而暗纹东方鲀则可以健康地生长, 这预示着暗纹东方鲀的肝脏可能对脂肪的耐受性强, 或者具有较强的脂肪代谢能力。因此, 暗纹东方鲀是很好的研究鱼类脂肪代谢机制的材料, 可以为鱼类抗脂肪肝机理的研究提供参考。但目前尚无关于暗纹东方鲀脂类营养需求及其调控方面的报道。

本研究首次克隆了暗纹东方鲀的心型脂肪酸结合蛋白 (heart-type fatty acid-binding protein, *H-FABP*) 基因的全长 cDNA 序列, 检测了其组织表达特异性, 并研究了饲料中不同比例豆油替代鱼油对其 mRNA 表达的影响, 为饲料脂肪源的开发提供理论依据, 为进一步研究 *H-FABP* 基因在暗纹东方鲀肝脏脂肪代谢、肌肉脂肪沉积以及心脏疾病防治等方面的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验鱼购自广州市金洋水产养殖有限公司, 其中组织表达实验用鱼平均体质量为 80 g, 取脑、鳃、肝脏、心脏、脾脏、肾脏、眼睛、肌肉、脂肪、肠道这 10 种组织, 用液氮速冻后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存。

养殖实验用鱼初始体质量平均为 8.31 g, 分成 4 组, 每组 3 个平行。脂肪源为广东省良种引进服务公司高美牌精炼饲用鱼油 (美国) 和市售豆油。以白鱼粉、豆粕、花生粕、酵母粉为蛋白源, 面粉为糖源, 在添加脂肪源为 9% 的水平上, 设计 4 个替代比例, 分别是豆油替代鱼油比例为 0、25%、50%、75%, 配制成人工配合饲料 (表 1)。养殖 8 周后, 每个平行随机取 3 尾鱼, 取肝脏组织用液氮速冻后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存。

表 1 实验饲料配方及营养成分 (风干基础, %)

Tab.1 Ingredients and composition of experimental diets (air-dry basis, %)

饲料原料 ingredients (g/100 g diet)	饲料 (豆油水平) / % diets (soybean oil)			
	A (0%)	B (25%)	C (50%)	D (75%)
鱼油 fish oil	9	6.75	4.5	2.25
豆油 soybean oil	0	2.25	4.5	6.75
白鱼粉 fish meal	32	32	32	32
豆粕 soybean meal	24	24	24	24
花生粕 peanut meal	10	10	10	10
面粉 wheat flour	10	10	10	10
酵母 yeast	2	2	2	2
氯化胆碱 chloride choline	0.5	0.5	0.5	0.5
VC 磷酸酯 vitamin C	0.5	0.5	0.5	0.5
矿物盐混合物 ¹ mineral premix	0.5	0.5	0.5	0.5
复合维生素 ² vitamin premix	2	2	2	2
磷酸二氢钙 monocalcium phosphate	2	2	2	2
CMC CM cellulose	2	2	2	2
纤维素 cellulose	3	3	3	3
诱食剂 attractant	2.5	2.5	2.5	2.5
营养成分 proximate composition				
粗脂肪 crude lipid	10.68	11.34	10.49	11.37
粗蛋白 crude protein	39.33	40.33	40.64	39.78
灰分 ash	9.74	9.67	9.88	9.37
水分 moisture	18.63	17.28	17.71	18.37

注: 1. 由广州飞禧特水产科技有限公司提供。2. 矿物盐混合物 (% 矿物盐混合物: 不含钙元素和磷元素) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.004; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.750; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.000; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 85.194; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.650; KI , 0.067; Na_2SeO_3 , 0.010; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6.597; 纤维素, 2.730

Notes: 1. Provided by Fish-Technology Co. Ltd. (Guangzhou, Guangdong, China). 2. Mineral mixture (g/100 g of premix): Does not contain calcium and phosphorus $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.004; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.750; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.000; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 85.194; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.650; KI , 0.067; Na_2SeO_3 , 0.010; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6.597; cellulose, 2.730

SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 和 Advantage[®] 2 PCR Enzyme System 购自 BD Biosciences Clontech 公司。Trizol、DEPC 水、PrimeScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeScriptTM RT reagent Kit、TaKaRa pMD 18-T Vector、*E. coli* DH 5 α 、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Perfect Real Time) 购自 TaKaRa 公司。TIANgel Midi Purification Kit 购自天根生化科技有限公司, 氯仿和异丙醇等其他试剂购自广州化学试剂公司。

1.2 实验方法

总 RNA 提取及 cDNA 模板制备 取冻存的各种组织提取 RNA, 用微量紫外分光光度计 Nanodrop 2000 和 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测所提总 RNA 的纯度和完整性, 按照 PrimeScript[®]

1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书反转录合成 cDNA, 稀释成 100 ng/ μL , $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。以肝脏组织的 RNA 为模板, 按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书制备 RACE 模板。

脂肪酸结合蛋白基因 cDNA 全长克隆 将 NCBI 数据库中红鳍东方鲀 (XM_003968832.1)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, XM_003444047.2) 和斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*, EU714180.1) H-FABP 的核苷酸序列进行比对, 在保守区域内设计简并引物 H-FABPF 和 H-FABPR (表 2)。PCR 反应体系: $2 \times \text{PCR Mix}$ 10 μL , cDNA 模板 2 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.8 μL , ddH₂O 补足至 20 μL 。PCR 反应程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测后, 用 TIANgel Midi Purification Kit 回收、纯化, 并连接于 pMD18-T 载体, 转化到感受态细胞 *E. coli* DH 5 α , 经 LB 平板 (含 Amp⁺) 培养后, 挑取阳性克隆送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。测序得到 139 bp 的扩增产物, 符合预期大小, 并经 BLAST 分析初步确定为心型脂肪酸结合蛋白基因的部分序列。

根据已获得的中间片段, 分别设计 5' 和 3' 端 RACE 所需的引物 (表 2), 第一次 PCR 反应体系 $2 \times \text{PCR Mix}$ 12.5 μL , 5' RACE-Ready cDNA 或 3' RACE-Ready cDNA 1 μL , $10 \times \text{UPM}$ 2.5 μL , GSP1 1.5 μL , ddH₂O 补足至 25 μL 。PCR 反应条

件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, 5 个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, 5 个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, 25 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。巢式 PCR 反应体系如下: $2 \times \text{PCR Mix}$ 12.5 μL , 模板 1 μL , 引物各 1.5 μL , ddH₂O 补足至 25 μL 。巢式 PCR 反应程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物的纯化、克隆和测序步骤与中间片段克隆的步骤所述相同。

序列拼接与生物信息学分析 将中间片段、5'-RACE 片段和 3'-RACE 片段利用 DNAMAN 进行拼接即可得到暗纹东方鲀 H-FABP 基因的 cDNA 全长。用 DNASTar 软件中的 EdiSeq 程序推断开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列; 用 NCBI 网站的 BLAST 程序进行编码蛋白序列的碱基同源性分析; 信号肽预测使用 SignalP 3.0 程序; 磷酸化分析使用 NetPhos 2.0 Sever 程序; 二硫键的预测由 SCRATCH Protein Predictor 程序完成; 利用 ClustalX 软件对相应的氨基酸序列进行多序列比对, 应用 MEGA 6.0 软件, 采用邻位相接法 (NJ 法) 构建系统发育树, 并用 Bootstrap 重复 1 000 次计算各分支的置信度。

实时荧光定量 PCR 检测 H-FABP 的表达情况 根据实验室测得的暗纹东方鲀 β -actin 核心序列设置 β -actin 荧光定量引物 β -actin-RTF 和 β -actin-RTR (表 2), 根据本实验测得的暗纹东方鲀 H-FABP 全长序列设置 H-FABP 荧光定量引物

表 2 暗纹东方鲀 H-FABP 基因克隆与表达分析的引物

Tab. 2 Primers designed for cloning and expression analysis of H-FABP gene from *T. obscurus*

引物名称 primer name	序列 (5'→3') sequence	用途 usage
H-FABPF	CTTCAAGCTGGGAGAGGA	RT-PCR
H-FABPR	GTTGACCTCCCTGACCAG	RT-PCR
H-FABP5'GSP1	CATCCCACTTCTGTACGTGCACCATCTT	5'-RACE
H-FABP5'GSP2	CGACTTAACATTCTGCCATCTGCGG	5'-RACE
H-FABP5'GSP3	CTGCGGTGGACTCATCAAACCTCTCTC	5'-RACE
H-FABP3'GSP1	GAGGAGTTTGATGAGTCCACCGCAGATG	3'-RACE
H-FABP3'GSP2	TCCACCGCAGATGGCAGGAATGTTA	3'-RACE
H-FABP3'GSP3	TGGTGCACGTACAGAAGTGGGATGATAA	3'-RACE
β -actin-RTF	CATCTACGAGGGCTACGC	Real-Time PCR
β -actin-RTR	ATGTCACGCACGATTTCC	Real-Time PCR
H-FABPRTF	ATCTCCATAGACGGCGACAAGG	Real-Time PCR
H-FABPRTR	TCTGCGGTGGACTCATCAAACCTC	Real-Time PCR

H-FABPRTF 和 H-FABPRTR (表 2)。荧光定量 PCR 的反应体系: $2 \times$ SYBR[®] Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) 10 μ L, 上下游引物各 0.8 μ L, ROX reference Dye2 0.4 μ L, ddH₂O 补足至 20 μ L。荧光定量 PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s; 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 60 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s。荧光定量 PCR 数据分析采用相对 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 暗纹东方鲀 *H-FABP* 基因及氨基酸序列分析

暗纹东方鲀 *H-FABP* 基因 cDNA 序列全长共 772 bp, 在 71 ~ 472 位置存在一个长 402 bp 的开放阅读框, 编码 133 个氨基酸, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA。编码区两侧为 70 bp 的 5' 非翻译区 (1 ~ 70 bp) 和 273 bp 的 3' 非翻译区 (473 ~ 745 bp), 在 3' 末端的 polyA 尾上游 19 bp 处有一个加尾信号, 为 AATAAA, 表明所获得片段包括全长的 mRNA 3' 非翻译区 (图 1)。

利用 DNASTar 中的 Ediseq 程序寻找 ORF 序列并将其翻译为相应的氨基酸序列, 发现暗纹东方鲀 *H-FABP* 基因翻译所得的蛋白共有 133 个氨基酸 (图 1), 其中包括 19 个强碱性氨基酸 (K、R), 21 个强酸性氨基酸 (D、E), 43 个疏水氨基酸 (A、I、L、F、W、V), 33 个极性氨基酸 (N、C、Q、S、T、Y)。蛋白分子量为 14 785.90 u。蛋白理论等电点为 5.447。通过 NetPhos 2.0 对 *H-FABP* 氨基酸序列的磷酸化位点进行预测, 发现该蛋白有 5 个 Ser, 9 个 Thr, 9 个 Tyr 可能成为蛋白激酶磷酸化位点, 通过 SMART 对编码蛋白进行蛋白质结构功能域分析, 发现该编码蛋白在 6 ~ 132 位置有一个脂质转运蛋白家族的保守结构域。通过 SignalP 4.1 Server 对该编码蛋白序列进行信号肽分析, 表明 *H-FABP* 氨基酸序列不存在 N 端信号肽及其切割点。通过 SCRATCH Protein Predictor 对该编码蛋白进行二硫键分析, 结果显示, *H-FABP* 氨基酸序列中只有一个半胱氨酸残基 (Cys¹²⁵), 因此无法形成二硫键。

```

1                               ATGGGGAGGC
11  GCTGGTTCACCCACTCGTCAGTCCTGTTTCATTCTCGTTTTGCTGCCGCTCACTGCAGAT
71  ATGGCCGAAGCTTTCGTCGGAACATGGAACCTCATTCAAGCGAGAAATTCGACGACTAC
1  M A E A F V G T W N L I S S E K F D D Y
131 ATGAAGGAGCTGGGTGTGGGCATGGCTCTGCGCAAGATGGGGGCCTGCCAAACCAAGC
21  M K E L G V G M A L R K M G G L A K P S
191 ACCATTATCTCCATAGACGGCGACAAGGTGGTACTGAAGACCTCAAGCACCTTCAAGAAC
41  T I I S I D G D K V V L K T S S T F K N
251 ACAGAAATCTCCTTCAAGCTGGGAGAGGAGTTTGATGAGTCCACCGCAGATGGCAGGAAT
61  T E I S F K L G E E F D E S T A D G R N
311 GTTAAGTCGACCATTAATATCGTAGATGGAAGATGGTGCACGTACAGAAGTGGGATGAT
81  V K S T I N I V D G K M V H V Q K W D D
371 AAAGAGACCACTCTGGTCAGGGAGGTCAACGACAAGGCCTCACTCTGACACTCACACTT
101 K E T T L V R E V N D K S L T L T L T L
431 GGAAAAGTCGTTGCACGCGCAATTATGAAAAGGCAGATTAAAAACCCAACACCCAAACC
121 G K V V C T R N Y E K A E *
491 TCTGGCCAGGCCTACCCGAGTCCCGGATGGTCTTGACCCTACAAAGACCTCGCATCAA
551 GACAACTGTCCATTGATTGCTGCTCATTCACTGTATGACACTATTGACATCGCCGTT
611 GACTGTAAACCCCTGTTCTAATGTTTCTGTCACTGAAGAAACCCCCCTTCAAATTCT
671 TGGCCTTTGTATTTTGTAAAGATTATGTTGTGCAAGGTGCCTCCAAACTGGAAAATA
731 AATGCATTTGTTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 暗纹东方鲀 *H-FABP* 基因 cDNA 全序列及推测氨基酸序列

起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TAA) 用方框表示, 多聚腺苷酸加尾信号 (AATAAA) 用下划线表示

Fig. 1 The nucleotide and predicted amino acid sequence of *H-FABP* in *T. obscurus*

The start codon (ATG) and the stop codon (TAA) were boxed. Putative polyadenylation signals (AATAAA) were underlined

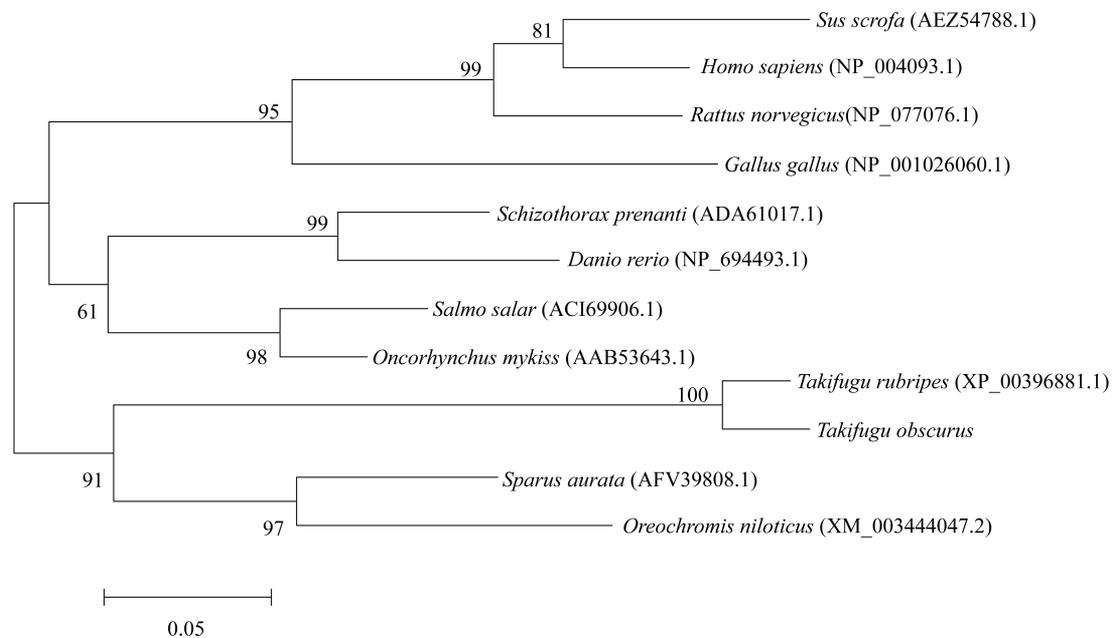


图3 根据 *H-FABP* 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

线长表示遗传距离;分支点的数字表示置信度,是 1 000 次重复计算的结果

Fig. 3 NJ phylogenetic tree of *H-FABP* amino acid sequence from *T. obscurus* and other species

The scale bar under the tree represented the amino acids substitution rate, and the bootstrap values(%) of 1 000 replicates were listed at the nodes

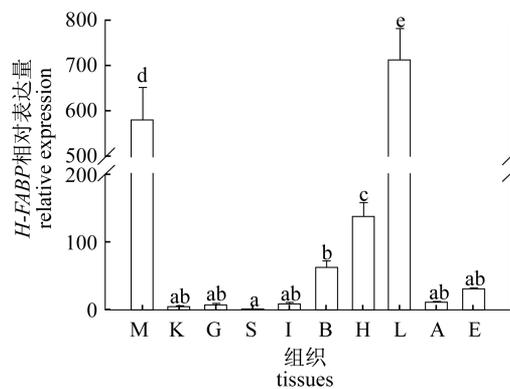


图4 暗纹东方鲀 *H-FABP* 基因在不同组织中的相对表达量

M. 肌肉; K. 肾脏; G. 鳃; S. 脾; I. 肠道; B. 脑; H. 心脏; L. 肝脏; A. 脂肪; E. 眼睛

字母不同为差异显著($P < 0.05$),反之则为差异不显著($P > 0.05$)

Fig. 4 The relative expressions of *T. obscurus H-FABP* gene in different tissues

M. muscle; K. kidney; G. gill; S. spleen; I. intestinal; B. brain; H. heart; L. liver; A. adipose; E. eye

The column with different letters means significant difference ($P < 0.05$), meanwhile the column with the same letter means no significant difference ($P > 0.05$)

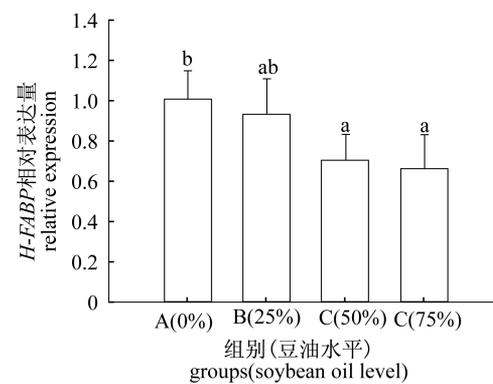


图5 豆油不同比例替代鱼油对暗纹东方鲀肝脏中 *H-FABP* 基因相对表达量的影响

字母不同为差异显著($P < 0.05$),反之则为差异不显著($P > 0.05$)

Fig. 5 The relative expressions of *H-FABP* gene in Liver from *T. obscurus* fed with diets in which the fish oil was substituted with different proportions of soybean oil

The column with different letters means significant difference ($P < 0.05$), meanwhile the column with the same letter means no significant difference ($P > 0.05$)

3 讨论

3.1 暗纹东方鲀 *H-FABP* 基因生物信息学分析

本研究采用 RACE 技术成功克隆了暗纹东方鲀 *H-FABP* 基因的全长 cDNA 序列,共 772 bp,其中开放阅读框为 402 bp,编码 133 个氨基酸,在鲀形目中属首次报道。对暗纹东方鲀 *H-FABP* 的氨基酸序列进行分析,发现在其 6~132 位有一个保守的脂质转运蛋白结构域,表明该蛋白具有脂肪酸转运功能。此外,该蛋白序列只有一个半胱氨酸残基,并且有多个蛋白激酶的磷酸化位点,与其他的脂肪酸结合蛋白类似,预测该蛋白可能参与蛋白激酶 C 的信号转导^[13]。不同类型脂肪酸结合蛋白的等电点不同^[14],这可以为脂肪酸结合蛋白的分类提供一定的理论支持,本实验得到的蛋白理论等电点为 5.447,偏酸性,这也初步说明得到的是心型脂肪酸结合蛋白。NJ 系统进化树显示,得到的蛋白序列与红鳍东方鲀的 *H-FABP* 蛋白序列的同源性高达 95%,与其他鱼类 *H-FABP* 蛋白序列的同源性也较高,可以进一步确定所得的蛋白是心型脂肪酸结合蛋白。从进化树中可以发现,鱼类与哺乳动物的 *H-FABP* 最后聚为一支,这与 Ando 等^[5]的研究结果一致,预示这一蛋白在鱼类与哺乳类有共同的祖先,在鱼类和哺乳类出现之后,机体才分化出了不同类型的脂肪酸结合蛋白。

3.2 暗纹东方鲀 *H-FABP* 基因组织表达特异性分析

本实验以 β -actin 基因作为内参基因,采用实时荧光定量 PCR 研究了暗纹东方鲀 *H-FABP* 基因在不同组织中的表达情况。结果显示,*H-FABP* 在所有被检测的组织中都有表达,但表达水平有所差异。在肝脏中的表达量最高,其次为肌肉,在心脏和脑中表达量也较高,而在肾脏、脾、鳃、肠道、脑、脂肪、眼睛的表达量较低。有关 *H-FABP* 基因的组织表达特点在其他物种也有过报道。哺乳动物的 *H-FABP* 基因主要在心肌和骨骼肌中表达^[15],鸡的 *H-FABP* 基因主要在肌肉和脂肪组织表达^[16]。由此可见,*H-FABP* 基因的组织分布在进化程度不同的物种之间差异较大。*H-FABP* 基因在不同鱼类的组织分布也不同,在南极冰鱼的心脏和肌肉中大量表达^[17],在侧边底鳉的肝、鳃和性腺中表达量最高^[18],在斑马鱼的卵巢和肝脏

中表达量最高^[19],在齐口裂腹鱼和鲤的肝脏中表达最高^[11]。暗纹东方鲀的 *H-FABP* 基因也是在肝脏中表达量最高,这点与侧边底鳉、斑马鱼、齐口裂腹鱼和鲤相似,可见 *H-FABP* 基因的组织表达特点与物种进化程度有关。暗纹东方鲀 *H-FABP* 基因的组织表达谱显示在肝脏中表达量最高,而不是在心脏,这可能与暗纹东方鲀的肝脏较大有关。暗纹东方鲀的肝脏较大,脂肪代谢就比较旺盛,因此需要表达大量的 *H-FABP* 等脂肪代谢相关的基因。这可能就是暗纹东方鲀的肝体比远大于其他鱼类却能健康生长的原因,也是本实验选择肝脏而不选择心脏作为克隆材料的原因。

3.3 暗纹东方鲀 *H-FABP* 基因功能预测

基因的组织表达特异性与其功能密切相关。*H-FABP* 基因在脂肪代谢旺盛的肝脏中表达量最高,说明该蛋白在脂肪酸的吸收与转运方面具有重要作用,参与肝脏对于脂肪酸的代谢与调节过程。鱼类与哺乳动物有一个很大的区别就是鱼类优先选择脂质作为其能量的主要来源,而肝脏对脂质代谢起着重要的调控作用,*H-FABP* 基因在肝脏中大量表达,可能是由于肝脏中源源不断地有脂肪酸输入,脂肪酸含量的增加促进 *H-FABP* 基因的转录,然后该蛋白再将脂肪酸转运到线粒体进行氧化分解,或者由极低密度脂蛋白运出肝脏外,最终维持肝脏中脂肪酸含量的相对稳定。该蛋白在肌肉中的表达量也很高,仅次于肝脏,可能是由于肌肉的收缩和舒张需要大量能量,而 *H-FABP* 可以将脂肪酸转运到线粒体进行氧化分解最终产生三磷酸腺苷供给肌肉进行生命活动。此外,*H-FABP* 与肌肉脂肪含量密切相关,因为其可以将脂肪酸转运到甘油三酯的合成部位,有利于脂肪沉积。Huang 等^[9]发现 *H-FABP* 基因与哈萨克羊的肌肉脂肪含量呈正相关关系。李文娟等^[10]发现 *H-FABP* 基因与北京油鸡、白菜航鸡和 AA 肉鸡的肌肉脂肪含量呈负相关关系,林亚秋等^[11]发现 *H-FABP* 基因与齐口裂腹鱼的肌肉脂肪含量呈正相关关系,与鲤的肌肉脂肪含量呈负相关关系。此外,*H-FABP* 基因在暗纹东方鲀的心脏和脑中表达量也较高,前者是由于其能够促进脂肪酸氧化生成 ATP 为心肌细胞供能^[20],后者是由于其参与神经细胞的信号转导^[3]。综上所述,*H-FABP* 可能在肝脏脂肪代谢、心肌氧化供能、肌间脂沉积以及神经细胞的信号转导等方

面具有重要的作用。

3.4 豆油替代鱼油对暗纹东方鲀 *H-FABP* 基因表达的影响

饲料脂肪源对 *H-FABP* 基因表达的影响可能与脂肪酸结合蛋白对配体具有选择性^[21],对不同脂肪酸的亲合力不同^[22]有关。饲料中脂肪源种类及其比例的改变会造成脂肪酸含量的变化。*H-FABP* 基因表达量的变化可能与多种脂肪酸有关。在众多脂肪酸当中,n-3 系列 PUFA 特别是 EPA^[23] 和 DHA^[24] 在调节脂肪代谢方面具有重要作用,能够抑制肝脏中脂肪合成相关基因的表达从而达到抗脂肪肝的功效^[25],推测其可能在影响 *H-FABP* 基因的表达中起主要作用。在豆油不同比例替代鱼油的实验中,随着豆油比例的增加,饲料中 EPA、DHA 含量呈下降趋势,*H-FABP* 基因的表达量也呈下降趋势。周继术等^[26] 研究表明,大豆油替代鱼油不影响大西洋鲑肝细胞对长链脂肪酸的跨膜吸收,可能是其饲料配方中鱼粉含量较高导致的结果。*H-FABP* 在肝脏对脂肪的吸收和吸收之后对脂肪的利用中都可能起作用,而目前认为 *H-FABP* 主要作用是将脂肪酸转运到线粒体进行氧化分解^[20]。饲料中豆油不同比例替代鱼油对暗纹东方鲀肝脏中 *H-FABP* 基因表达的影响机制可能与过氧化物酶体增殖物激活受体 PPAR 有关。推测 DHA 和 EPA 等 n-3PUFA 进入细胞核与 PPAR- α 结合,激活的 PPAR- α 与顺式作用元件相互作用,启动下游的 *H-FABP* 等脂肪分解相关基因的转录,从而避免肝脏中脂肪的沉积^[27]。由此可见,富含 n-3PUFA 的鱼油能促进脂肪酸氧化分解,从而达到预防脂肪肝的效果。如果饲料中鱼油比例过低将会由于 n-3PUFA 缺乏从而导致脂肪肝的产生,因此,饲料中豆油替代鱼油的比例应控制在 50% 以下。

参考文献:

- [1] Fschaap F G, van der Vusse G J, Glatz J F C. Fatty acid-binding proteins in the heart [M]. Springer US: Cardiac Metabolism in Health and Disease, 1998: 43 - 51.
- [2] Spener F, Borchers T, Mukherjea M. On the role of fatty acid binding proteins in fatty acid transport and metabolism [J]. FEBS Letters, 1989, 244 (1): 1 - 5.
- [3] Feng L, Hatten M E, Heintz N. Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the

developing mammalian CNS [J]. Neuron, 1994, 12 (4): 895 - 908.

- [4] Ockner R K, Manning J A, Poppenhausen R B, et al. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues [J]. Science, 1972, 177 (4043): 56 - 58.
- [5] Ando S, Xue X H, Tibbits G F, et al. Cloning and sequencing of complementary DNA for fatty acid binding protein from rainbow trout heart [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 119 (1): 213 - 217.
- [6] Arimoto T, Takeishi Y, Shiga R, et al. Prognostic value of elevated circulating heart-type fatty acid binding protein in patients with congestive heart failure [J]. Journal of Cardiac Failure, 2005, 11 (1): 56 - 60.
- [7] Ma D, Wang W X, Wang X P, et al. Fatty acid-binding protein for the early diagnosis of acute myocardial infarction [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2001, 24 (4): 220 - 222. [马达, 王万相, 王小平, 等. 脂肪酸结合蛋白在急性心肌梗死诊断中的应用. 中华检验医学杂志, 2001, 24 (4): 220 - 222.]
- [8] Gerbens F, Verburg F J, Van Moerkerk H T, et al. Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs [J]. Journal of Animal Science, 2001, 79 (2): 347 - 354.
- [9] Huang Z G, Xiong L, Liu Z S, et al. The developmental changes and effect on IMF content of H-FABP and PPAR γ mRNA expression in sheep muscle [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33 (6): 507 - 514. [黄志国, 熊俐, 刘振山, 等. 绵羊肌肉 H-FABP 和 PPAR γ 基因表达的发育性变化及其对肌肉脂肪含量的影响. 遗传学报, 2006, 33 (6): 507 - 514.]
- [10] Li W, Li H, Wen J, et al. Association of the *H-FABP* and *A-FABP* gene expression with intramuscular fat content in chickens [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2006, 37 (5): 417. [李文娟, 李宏宾, 文杰, 等. 鸡 *H-FABP* 和 *A-FABP* 基因表达与肌肉脂肪含量相关研究. 畜牧兽医学报, 2006, 37 (5): 417 - 423.]
- [11] Lin Y Q, Li R W, Zheng Y C. Cloning and expression profile of heart-type fatty acid-binding protein in *Schizothorax prenanti* and *Cyprinus carpio* [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular

- Biology, 2011, 27(6): 554 - 560. [林亚秋, 李瑞文, 郑玉才, 等. 齐口裂腹鱼和鲤鱼 *H-FABP* 基因的克隆及其表达谱. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(6): 554 - 560.]
- [12] Cheng Q T, Wang C X, Tian M C, *et al.* Studies on the Chinese Tetraodonoid fishes of the genus *Fugu* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1975, 21(4): 359 - 378. [成庆泰, 王存信, 田明诚, 等. 中国东方鲀属鱼类分类研究. 动物学报, 1975, 21(4): 359 - 378.]
- [13] Wang Y P, Geng R Q, Ji D J C, *et al.* cDNA cloning of heart fatty acid binding protein gene from goat and its bioinformatic analysis [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(23): 17 - 20. [王兰萍, 耿荣庆, 冀德君, 等. 山羊心脏型脂肪酸结合蛋白 cDNA 序列克隆及生物信息学分析. 中国农学通报, 2011, 27(23): 17 - 20.]
- [14] Luo Y F, Wang Y X. Structural and functional characteristics of fatty acid binding protein [J]. *Chemistry of Life*, 1992, 12(6): 22 - 25. [罗永福, 王云霞. 脂肪酸结合蛋白的结构与功能特征. 生命的化学, 1992, 12(6): 22 - 25.]
- [15] Zimmerman A W, Veerkamp J H. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2002, 59(7): 1096 - 1116.
- [16] Wang Q, Li H, Liu S, *et al.* Cloning and tissue expression of chicken heart fatty acid-binding protein and intestine fatty acid-binding protein genes [J]. *Animal Biotechnology*, 2005, 16(2): 191 - 201.
- [17] Vayda M, Londraville R, Cashon R, *et al.* Two distinct types of fatty acid-binding protein are expressed in heart ventricle of Antarctic teleost fishes [J]. *Journal of Biochemistry*, 1998, 330: 375 - 382.
- [18] Bain L J. cDNA cloning, sequencing, and differential expression of a heart-type fatty acid-binding protein in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*) [J]. *Marine Environmental Research*, 2002, 54(3): 379 - 383.
- [19] Liu R Z, Denovan-Wright E M, Wright J M. Structure, linkage mapping and expression of the heart-type fatty acid-binding protein gene (*fabp3*) from zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(15): 3223 - 3234.
- [20] Dong J J. Advances in protein determination and clinical application of fatty acid binding [J]. *Foreign Medical Sciences Section of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine*, 2001, 22(2): 74 - 76. [董解菊. 脂肪酸结合蛋白测定及临床应用研究进展. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 2001, 22(2): 74 - 76.]
- [21] Veerkamp J H, Peeters R A, Maatman R. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1991, 1081(1): 1 - 24.
- [22] Veerkamp J H, Paulussen R J A, Peeters R A, *et al.* Detection, tissue distribution and (sub) cellular localization of fatty acid-binding protein types [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1990, 98(1-2): 11 - 18.
- [23] Liu P, Ji H, Li C, *et al.* Impact of EPA on proliferation and differentiation of preadipocytes from grass carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(3): 418 - 424. [刘品, 吉红, 李超, 等. EPA 对草鱼前体脂肪细胞增殖分化的影响. 水生生物学报, 2013, 37(3): 418 - 424.]
- [24] Hsu J M, Wang P H, Liu B H, *et al.* The effect of dietary docosahexaenoic acid on the expression of porcine lipid metabolism-related genes [J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 82(3): 683 - 689.
- [25] Zhu Y Z, Wang J F, Mao L, *et al.* Effects of fish oil with high DHA/EPA and triglycerides on lipid metabolism in fatty liver rats [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2013, 35(4): 332 - 337. [朱昱哲, 王静凤, 毛磊, 等. 高含量 DHA/EPA 甘油三酯鱼油改善脂肪肝大鼠脂质代谢作用的研究. 营养学报, 2013, 35(4): 332 - 337.]
- [26] Zhou J S, Torstensen B E, Stubhaug I, *et al.* Effects of replacing dietary fish oil with soybean oil on fatty acid metabolism in hepatocytes of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 18(1): 121 - 127. [周继术, Torstensen B E, Stubhaug I, 等. 饲料中植物油替代鱼油对大西洋鲑肝细胞油酸跨膜吸收的影响. 水生生物学报, 2014, 18(1): 121 - 127.]
- [27] Clarke S D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription; a mechanism to improve energy balance and insulin resistance [J]. *British Journal of Nutrition*, 2000, 83(S1): S59 - S66.

Molecular cloning and feature analysis of heart-type fatty acid-binding protein *H-FABP* gene from obscure puffer (*Takifugu obscurus*)

LIAO Yuying, YE Chaoxia, YIN Jiaqi, WU Yingxia, WANG Anli*
(Key Laboratory of Ecology and Environment Science of Guangdong Higher Education Institutes,
Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, College of Life Science,
South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: In order to understand the structure and function of heart type fatty acid binding protein H-FABP, the full-length cDNA sequence of H-FABP gene was cloned from obscure puffer (*Takifugu obscurus*) by using SMART RACE technique. The entire H-FABP cDNA was 772 bp, containing a 402 bp open reading frame encoding a protein with 133 amino acids. Bioinformatics analysis indicated that the H-FABP gene had a conserved domain of lipocalin family and several phosphorylation sites. Phylogenetic analysis indicated that the H-FABP gene of *Takifugu obscurus* was closely related to *Takifugu rubripes*, followed by that of Perciformes. Real-time PCR revealed that H-FABP gene was ubiquitously expressed in all tested tissues. The highest expression of H-FABP was tested in the liver, followed by muscle and heart. This indicates that H-FABP is mainly involved in fatty acid oxidation process. To evaluate the feasibility of using soybean oil as a dietary lipid, juvenile fish were fed with four formulated diets differing in lipid composition, with soybean oil accounting for 0, 25%, 50% and 75% of total dietary lipid respectively. After feeding for 8 weeks, the expression of H-FABP gene in the liver of the fish oil group was significantly higher than those in 50% soybean oil group and 75% soybean oil group ($P < 0.05$). However, there was no significant difference ($P > 0.05$) between the 25% soybean oil group and the fish oil group. The expression of H-FABP gene in the liver decreased with the increasing of the proportion of soybean oil in diets, indicating that fish oil rich in n-3 polyunsaturated fatty acids can promote fatty acid oxidation and prevent fatty liver. Therefore, in order not to affect the liver fat metabolism of obscure puffer, the proportion of soybean oil instead of fish oil should be less than 50%.

Key words: *Takifugu obscurus*; heart-type fatty acid-binding protein; cloning; expression analysis

Corresponding author: WANG Anli. E-mail: wanganl@scnu.edu.cn