

鲤脂蛋白脂肪酶基因特性、表达分布、 重组蛋白获得及酶活性比较

王钰婧¹, 冯文荣^{1,2}, 徐逾鑫¹, 李建林^{1,2},
苏胜彦^{1,2}, 俞菊华^{1,2}, 唐永凯^{1,2*}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214128;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业与
种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要: 为研究鲤脂蛋白脂肪酶 (*CcLPLs*) 的基因特征、时空表达分布及酶活性, 实验利用基因组同源搜索获取鲤 *CcLPLs* 同源基因并分析其序列特征; 通过荧光定量 PCR (qPCR) 方法对 *CcLPLs* 在不同组织的表达进行分析; 采用原核表达系统获取 *CcLPLs* 重组蛋白, 并使用对硝基苯酚法测定各重组蛋白的酶活性。结果显示, 鲤基因组中挖掘到 5 个 *CcLPLs* 基因 (*CcLPLA1a*、*CcLPLA1b*、*CcLPLA2a*、*CcLPLA2b** 和 *CcLPLBa*), 经验证, *CcLPLA2b** 是假基因, 共线性分析显示, 鱼类特有基因组加倍过程中出现基因丢失的现象, 而鲤特有的基因组加倍致使鲤存在 5 个 *CcLPLs*。 *CcLPLA1a* 和 *CcLPLA1b* 核苷酸序列和氨基酸序列相同, 同源性分析显示, *CcLPLBa* 与 *CcLPLA1s* 的同源性为 64%, 与 *CcLPLA2a* 同源性为 50.8%。 qPCR 结果显示, *CcLPLs* 的表达量在肝脏、心脏、脂肪、肌肉、脑、肠道和脾脏中依次降低, 在各个组织中, 各基因表达量从高到底依次为 *CcLPLA1s*、*CcLPLA2a* 和 *CcLPLBa*。 鲤正常投喂、饥饿及再投喂状态下 *CcLPLA1s* 和 *CcLPLA2a* 在肝脏、肌肉和脂肪组织中的表达结果显示, 饥饿状态下, *CcLPLA1s* 和 *CcLPLA2a* 在肝脏中的表达量高于正常投喂组, 而在肌肉和脂肪中低于正常投喂组; 再投喂后, *CcLPLA1s* 和 *CcLPLA2a* 在肝脏中表达水平降至正常投喂组, 而在肌肉和脂肪中表现为先升高后降低的趋势。通过构建具有促溶效果的原核表达载体, 分别获得了原核表达重组蛋白 Skp-*CcLPLs* 和 SlyD-*CcLPLs*, 酶活性测定结果显示, 重组蛋白其脂蛋白脂肪酶活性从高到低依次为 *CcLPLA1a*、*CcLPLBa* 和 *CcLPLA2a*, 最适 pH 均为 8.0, 发挥最大活性的 NaCl 浓度为 0.6 mol/L。本研究探讨了鲤 *CcLPLs* 同源基因在进化中的表现, 对 *CcLPLA1s*、*CcLPLA2a* 和 *CcLPLBa* 的时空表达进行了分析, 测定了投喂和饥饿对 *CcLPLA1s*、*CcLPLA2a* 表达的影响, 揭示鲤饥饿胁迫下脂质代谢及响应对策, 为控制鲤脂肪含量提供靶点, 成功进行重组蛋白的原核表达并测定了其酶活性, 为鱼类脂蛋白脂肪酶研究提供参考。

关键词: 鲤; 脂蛋白脂肪酶; 基因表达; 原核表达; 脂蛋白脂肪酶活性

中图分类号: S 963.1

文献标志码: A

收稿日期: 2022-10-11 修回日期: 2022-11-10

资助项目: 国家大宗淡水鱼产业技术体系专项 (CARS-45); 国家重点研发计划 (2022YFF0608203); 中国水产科学研究院基本科研业务费 (2020TD37)

第一作者: 王钰婧 (照片), 从事水产动物遗传育种研究, E-mail: wangyujing029@163.com

通信作者: 唐永凯, 从事鱼类育种研究, E-mail: tangyk@ffrc.cn



脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL) 是脂酶家族的一员, 能够水解甘油三酯, 释放游离脂肪酸和单酰甘油, 供组织吸收利用或储存在脂肪组织中^[1], 动物组织脂肪沉积主要取决于组织中的脂肪合成与分解, 甘油三酯的分解速率在此过程中发挥着重要作用, 在甘油三酯分解的过程中, LPL 起着关键的调控功能, LPL 常以同源二聚体的形式发挥甘油三酯水解酶和在受体介导的脂蛋白摄入时作为配体和桥接因子的双重功能。LPL 最初作为“清除因子脂肪酶”在狗 (*Canis lupus familiaris*) 体内被发现^[2-3], 并在 1966 年被正式命名为脂蛋白脂肪酶^[4]。1987 年, Wion 等^[5]克隆了人 (*Homo sapiens*) LPL 基因, 全长约 36 kb, 包含 10 个外显子和 9 个内含子, 编码 448 个氨基酸的糖蛋白, 分子量约为 55 ku, 包含 N 末端和 C 末端 2 个高度保守的结构域, N 端含有 Ser¹³²-His²⁴¹-Asp¹⁵⁶ 催化三联体, C 端含有对结合脂蛋白至关重要的肝素结合区^[6]。研究表明, LPL 参与了多种疾病的发生发展, 如动脉粥样硬化^[7-8]、高血压^[9]、糖尿病^[10] 等。

多种鱼类的 LPL 基因已被挖掘研究, 包括斑马鱼 (*Danio rerio*)^[11]、真鲷 (*Pagrus major*)^[12]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[13]、金头鲷 (*Sparus aurata*)^[14]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[15]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[16] 等。鱼类 LPL 表达广泛, 肝脏、脂肪、肌肉、心脏、肾脏、肠道和性腺等组织中均有表达^[16-17], 其中肝脏和脂肪组织中的表达量相对较高, 肾脏、肠道等组织的表达量较低^[16-19]。基于鱼类中的多倍化现象^[20], 在真鲷^[21]、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)^[22]、克拉克钩吻鲀 (*Oncorhynchus clarkii*)^[23]、青鳉 (*Oryzias latipes*)^[24] 等多倍体鱼类中挖掘到了 2 种 LPL 同源基因 (LPL1 和 LPL2), 研究表明, LPL1 在肝脏、脂肪、肌肉等组织中的表达量是 LPL2 的 10 倍以上^[22], 表明同源基因在进化过程中表达特性和功能出现了差异^[25-27]。研究表明, LPL 表达水平受到营养和激素等多方面的调控, Oku 等^[21] 测定了饥饿和再投喂对 LPL 表达影响, 表明 LPL 的表达受到营养状况的调控。

重组蛋白表达中, 分子伴侣是一类能够帮助其他蛋白质正确折叠的蛋白质, 是外源基因在异源系统中稳定表达的调节器^[28-29]。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 17-kilodalton protein 由 *skp* 基因编

码, 具有分子伴侣的功能^[30-31]。大肠杆菌 SlyD 蛋白具有双结构域, 分别是 FKBP 结构域和 IF 结构域, IF 结构域主要发挥分子伴侣的作用^[32-33]。将 Skp 和 SlyD 作为分子伴侣用于原核重组蛋白表达系统, 可促进目标蛋白的可溶性。

鲤是我国重要的大宗淡水养殖鱼类, 是典型的四倍体生物, 其基因组测序已完成, 为功能基因的研究奠定了良好基础。已有的关于鲤 LPL 基因的研究仅报道了单个基因的 cDNA 序列和表达特征^[16], 鲤 LPLs 同源基因报道并不全面; 且鱼类中 LPLs 蛋白酶活性的研究较为缺乏。本实验通过鲤基因组搜索, 系统发掘鲤 LPLs 同源基因, 研究其基因特征、时空表达分布; 构建含 Skp 和 SlyD 融合标签的鲤 LPLs 重组蛋白表达系统, 并测定了重组同源蛋白的酶活性, 为探究鱼类 LPL 基因功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与取样方法

鲤采自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴养殖基地。用于摄食、饥饿及重摄食的实验鲤平均体重为 (43.0 ± 5.5) g, 于养殖室循环水养殖系统内暂养 10 d, 水温控制在 25 °C, pH 为 7.2~7.6, 每天定时投喂饲料, 投喂量约为鲤体重的 1%。实验过程中操作人员严格遵守实验动物伦理规范, 并按照南京农业大学实验动物福利与伦理委员会制定的《南京农业大学实验动物管理办法》执行。

鲤组织取样 为验证 CcLPLs 基因表达分布, 实验随机取 3 尾鱼, 对其进行麻醉后取样, 取肝脏、心脏、肌肉、脂肪、脑、肠、脾脏 7 个组织 -80 °C 冰箱保存。

鲤摄食、饥饿及重摄食组取样 为测定饥饿和重摄食对 CcLPLs 的影响, 我们设计了投喂组 (正常投喂)、饥饿组 (禁食) 和再投喂组 (禁食后再投喂), 具体实验设计和取样时间见表 1。每个实验组每个时间点取随机取 3 尾实验鱼, 每尾实验鱼取肝脏、背部肌肉、腹部脂肪 3 个组织, -80 °C 冰箱保存。

1.2 鲤 LPLs 基因同源搜索及引物设计

通过在鲤基因组 (ASM1834038v1) 中进行同源搜索, 获取鲤 LPLs 同源基因。CcLPLA1a 和

表 1 鲤投喂组、饥饿组及再投喂组实验设计

Tab. 1 Experiment design of feeding, starvation and refeeding groups in *C. carpio*

分组 groups	实验设计及取样 experiment design and sampling time
投喂组 feeding group	投喂后1、3、6和24 h取样
饥饿组 starvation group	分别在饥饿174、192、342和360 h取样
再投喂组 refeeding group	再投喂54和72 h取样

CcLPLA1b 具有相同的核苷酸序列和氨基酸序列, 因此文中统称为 CcLPLA1s。以获得的鲤 *LPLs* CDS 序列为模板, 使用 NCBI Primer-Blast 及 Primers 6.0 软件设计鲤 3 种 *CcLPLs* (*CcLPLA1s*、*CcLPLA2a* 和 *CcLPLBa*) 特异性引物 (表 2)。引物对 CcLPLA1s-F/R、CcLPLA2a-F/R、CcLPLBa-F/R 分别为鲤 *CcLPLA1s*、*CcLPLA2a* 和 *CcLPLBa* 组织表达荧光定量 PCR (qPCR) 定量引物; β -actin-F/R 为 qPCR 内参基因引物。LPL1-F/R、LPL2-F/R、LPLB-F/R 分别为 *CcLPLA1a*、*CcLPLA2a* 和 *CcLPLBa* 基因片段 PCR 扩增引物, 用于重组蛋白质构建; Skp-F/R、SlyD-F/R 分别为 PCR 扩增大肠杆菌 *skp* 和 *slyD* 基因片段 PCR 扩增引物, 用

表 2 实验引物

Tab. 2 Experimental primers

引物 primers	引物序列(5'-3') nucleotide sequence (5'-3')
CcLPLA1s-F	GCAACTTCGATTGAACCAGCG
CcLPLA1s-R	CTGGATGAAGTTACATTCCTTTGATGG
CcLPLA2a-F	GTCTGTTTCGCTCGTCTCTGG
CcLPLA2a-R	GCTGCAGCTGTTGAGAGTCTCTG
CcLPLBa-F	GCAATTTCTCTTATTGCGAGCGA
CcLPLBa-R	GAAGTTCAGTCCGAAATAGAGTCC
LPL1-F	CGGAATTCGCAACTTCGATTGAACCAG
LPL1-R	CCGCTCGAGTCACTCGGTGCTCTGTTGAA
LPL2-F	CGGAATTCGAAAAGAAAATTTTCAGCAAT
LPL2-R	CCGCTCGAGTTACTGGCTTTTCAGCTTCG
LPLB-F	CGGAATTCCTCAATAGCAATAGCACCCAAAG
LPLB-R	CCGCTCGAGTTAATAGAAGCGCAGCGCGTT
Skp-F	GGAATTCATATGGCTGACAAAATTGCAATC
Skp-R	CCGGAATCTTTAACCTGTTTACAGTACGTCGGCAG
SlyD-F	GGAATTCATATGAAAGTAGCAAAAAGACC
SlyD-R	CCGGAATTCGTGCAACCGCAACCG
β -actin-F	CGCCCCAGACATCAGGGTG
β -actin-R	GTGTTGAAGGTCTCAACATGATCTGTG

于重组蛋白质构建。所有引物由无锡亦欣生物科技有限公司合成。

1.3 鲤 *LPLs* 序列分析

鲤及其他鱼类 *LPLs* 基因所在连锁群信息来自 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 使用 Genomicus(v95.01)^[34] 对鱼类 *LPL* 基因进行共线性分析。使用 DNAMAN 7.0 软件对 3 种鲤 CcLPLs 氨基酸序列与其他物种氨基酸序列进行同源性比对分析。

1.4 总 RNA 提取、逆转录和 qPCR

不同组织总 RNA 的提取依照总 RNA 提取试剂盒 (Omega Bio-Tek, 上海) 说明书进行, 并通过分光光度计测定总 RNA OD_{260/280} 值及对总 RNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳来检测纯度和完整性。按照 Primer Script™ RT Master Mix (Perfect Real Time) 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 合成 cDNA。qPCR 使用荧光定量试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq II™ (TaKaRa, 大连)。

1.5 原核重组表达质粒的构建及表达纯化

Skp-pET 和 SlyD-pET 原核表达载体的构建分别以 Skp-F/R 和 SlyD-F/R 为引物, 大肠杆菌为模板, PCR 分别获得 *skp* 和 *slyD* 基因片段。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 进行切胶纯化回收。使用限制性酶切酶 *Nde* I 和 *Eco* R I 对 pET43.1 质粒、Skp 和 SlyD 进行双酶切, 连接, 构建 Skp-pET 和 SlyD-pET 载体。

Skp-CcLPLs-pET 和 SlyD-CcLPLs-pET 重组质粒的构建 选取鲤 CcLPLA1a、CcLPLA2a 和 CcLPLBa 进行重组蛋白表达。分别以 LPL1-F/R、LPL2-F/R 和 LPLB-F/R 为引物 (表 2), 以鲤 cDNA 为模板, PCR 分别扩增 3 个 *CcLPLs* 基因, 经琼脂糖凝胶电泳后, 进行切胶回收。使用限制性内切酶 *Eco* R I 和 *Xho* I 对 Skp-pET 载体、SlyD-pET 载体和 3 种 *CcLPLs* 基因片段进行双酶切, 连接, 构建 Skp-CcLPLs-pET 和 SlyD-CcLPLs-pET 重组质粒。将各重组质粒转化至 DH5 α 感受态细胞中, 使用菌液 PCR 筛选阳性单克隆, 并送至亦欣生物科技 (上海) 有限公司进行测序验证。经验证正确后, 对菌液进行扩培, 使用质粒提取试剂盒 (TaKaRa, 大连) 提取质粒。

重组质粒的原核表达 将成功构建的各重组质粒, 分别转化至 Transetta (DE3) 感受态细胞 (北京全式金生物有限公司) 中, 挑取阳性单克隆

至 10 mL 氨苄抗性的 LB 液体培养基中, 37 °C, 200 r/min 摇约 12 h, 以 1 : 100 的比例扩大培养 2~3 h, 待 OD₆₀₀ 值在约 0.6 时, 加入终浓度 0.1 mmol/L IPTG 诱导剂, 诱导 12 h, 5 000 r/min 离心 15min 收集细菌沉淀, 加入含有苯甲基磺酰氟 (PMSF)(碧云天生物科技有限公司) 的裂解液进行超声, 超声后, 12 000 r/min 离心 15 min, 分别收集上清液和沉淀, 将总菌和超声后的上清液进行 SDS-PAGE 电泳。

重组蛋白纯化 分别将非变性上清液和经尿素裂解液溶解变性后的上清液, 通过 0.22 μm 滤膜过滤后, 使用镍柱 (碧云天生物科技有限公司) 亲和层析的方法纯化目的蛋白, 反复上柱 3 次, 并依次通过不同浓度的咪唑非变性裂解液洗脱目的蛋白。

1.6 三种 CcLPLs 重组蛋白的脂蛋白脂肪酶活性测定

采用对硝基苯酚法测定 3 种 CcLPLs 重组蛋白的脂蛋白脂肪酶活性^[35]。在 30 °C, pH 8.0 条件下, 分别测定 3 种 CcLPLs 重组蛋白的脂蛋白脂肪酶活性, 每组设置 3 个平行。

1.7 三种 CcLPLs 重组蛋白的酶特性

pH 对 CcLPLs 重组蛋白的脂蛋白脂肪酶活性的影响 为研究 pH 对鲤重组脂蛋白脂肪酶活性的影响, 实验控制反应温度为 30 °C^[35]。分别加入等浓度的重组蛋白, 分别用 HCl 和 NaOH 调节各体系 pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0, 最后加 Tris-HCl 至体系体积为 220 μL, 每组设置 3 个平行, 设置 1 组用灭菌水替代蛋白样品的对照组, 30 °C 条件下孵育 5 min, 在 410 nm 处测定各孔吸光值, 记录孵育后的初始吸光值, 往后每 10 min 记录一次吸光值, 反应 60 min 后终止反应。

NaCl 对 CcLPLs 重组蛋白的脂蛋白脂肪酶活性的影响 为研究 NaCl 对鲤重组脂蛋白脂肪酶活性的影响, 实验控制反应温度 30 °C、pH8.0。使用 Tris-HCl (50 mmol/L, pH8.0) 配制浓度为 4 mol/L 的 NaCl 溶液, 设置不同的 NaCl 浓度 (220 μL 体系里摩尔体积浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.7、1.0 和 1.5 mol/L) 分别加入到 100 μL 重组蛋白中孵育 30 min, 孵育结束后, 加入到 96 孔酶标仪中, 每孔加入 11 μL 底物溶液, 最后加入 Tris-HCl (50 mmol/L, pH8.0) 至体系总

体积为 220 μL, 每组设置 3 个平行, 设置 1 组用灭菌水替代蛋白样品的对照组, 30 °C 条件下孵育 5 min, 在 410 nm 处测定各孔吸光值, 记录孵育后的初始吸光值, 往后每 10 min 记录一次吸光值, 反应 60 min 后终止反应。

三种 CcLPLs 重组蛋白的酶促动力学 为测定鲤重组脂蛋白脂肪酶 K_m 值, 实验控制反应温度为 30 °C、pH8.0。以对硝基苯酚棕榈酸酯 (p-NPP) 为底物, 将配制好的 p-NPP 底物溶液 (10 mmol/L) 用 Tris-HCl (50 mmol/L, pH8.0) 进行稀释, 分别稀释至 220 μL 体系里浓度分别为 0.05、0.10、0.25、0.75、1.00 和 1.50 mmol/L, 分别加入 100 μL 重组蛋白, 最后加入 Tris-HCl (50 mmol/L, pH8.0) 至体系总体积为 220 μL, 每组设置 3 个平行, 设置 1 组用灭菌水替代蛋白样品的对照组, 30 °C 条件下孵育 5 min, 在 410 nm 处测定各孔吸光值, 记录孵育后的初始吸光值, 往后每 10 min 记录一次吸光值, 反应 60 min 后终止反应。

1.8 数据分析

使用 SPSS 28.0 软件对数据进行处理, 用单因素方差分析, 差异显著水平为 $P < 0.05$, 极显著性差异为 $P < 0.01$, 结果用平均数 ± 标准差 (mean ± SD) 来表示。

2 结果

2.1 鲤 CcLPLs 序列分析

鲤 CcLPLs 共线性分析 使用 Genomicus (v95.01) 软件对斑点雀鳊 (*Lepisosteus oculatus*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)、墨西哥丽脂鲤 (*Astyanax mexicanus*)、电鳗 (*Electrophorus electricus*)、罗非鱼 (*Oreochromis spp.*)、青鳉以及鲤 LPLs 进行共线性分析 (图 1)。结果显示, 雀鳊中, 一条连锁群上存在 2 个 LPL 同源基因 (*LPLA1* 和 *LPLA2*), *LPLA1* 与 *LPLA2* 相邻并位于其上游, *LPLs* 上游基因为 *CIB3*、*RAB8a* 和 *TPM4a*, 下游基因为 *SAFB*、*CALR3b*、*RAD23ab*、*EPS15L1a*、*KLF2a* 和 *AP1m1*。经鱼类特有的基因组加倍 (fish - specific genome duplication, FSGD 或 3R) 后, 除了罗非鱼和青鳉外, 其他鱼 3R 中均在另一条连锁群上出现了一个 *LPLB* 基因, 独立位于一条连锁群上。鲤经常见特异性基因组复制 (common carp specific genome duplication, CcSGD) 后出现了 3 条连锁群,

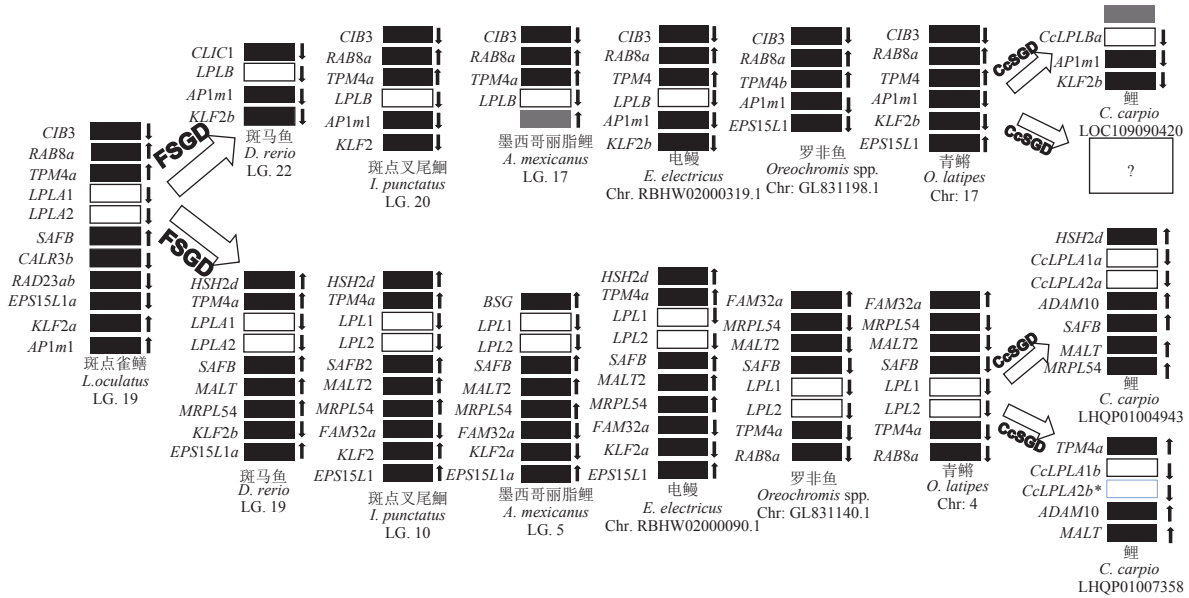


图 1 硬骨鱼类及其祖先 LPLs 共线性分析

图中白色方块代表目标基因 LPL, 其余方块分别为 LPL 上下游基因, 箭头表示转录方向。

Fig. 1 Schematic diagram of synteny of LPLs in teleosts and their ancestors

The white block represent target gene LPL, the others represent upstream and downstream genes of LPL, the arrow indicates direction of transcription.

LOC109090420 连锁群上存在一个 *CcLPLBa* 基因, LHQP01004943 连锁群上找到了 2 个 LPL 基因, *CcLPLA1a* 为 *CcLPLA2a* 上游基因, LHQP01007358 连锁群上也出现了 2 个 LPL 基因, *CcLPLA1b* 为 *CcLPLA2b** 上游基因, 其中 *CcLPLA2b** 经鉴定为假基因。

鲤 CcLPLs 氨基酸序列相似性分析 使用 DNAMAN7.0 对 3 种鲤 CcLPLs 与斑马鱼 DrLPLs、智人 HsLPL、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) RnLPL、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*) GaLPLs、罗非鱼 OnLPL、草鱼 CiLPL 氨基酸序列同源性比较(表 3), 鲤 3 种 CcLPLs 中, CcLPLBa 与 CcLPLA1s 氨基

表 3 鲤 LPLs 与其他物种 LPL 氨基酸同源性比较

Tab. 3 Comparison of amino acid homology among LPLs in *C. carpio* and other species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		48.8	64.0	88.8	49.9	63.2	59.9	60.0	67.9	49.4	48.8	53.6
2			50.8	47.1	81.4	50.7	51.4	51.7	45.0	65.1	67.5	48.0
3				65.1	50.3	85.8	58.2	59.0	60.4	49.0	50.4	65.9
4					48.1	65.7	60.1	59.8	67.3	47.6	48.8	88.2
5						50.0	53.2	53.5	46.5	65.9	67.7	48.3
6							56.9	57.7	61.6	48.0	50.1	65.0
7								92.2	57.1	51.7	54.5	59.7
8									56.8	52.0	54.8	59.4
9										46.0	48.3	66.5
10											79.5	47.8
11												48.4
12												

注: 右上角数据为相似性, 1~3 分别为鲤 CcLPLA1s (ACN66301.1), CcLPLA2a (XP_026201401.1), CcLPLBa (XP_042575005.1); 4~6 分别为斑马鱼 DrLPL1 (NP_571202.1), DrLPL2 (XP_002666287.3), DrLPLB (NC_007133.7); 7. 智人 HsLPL (NP_000228.1); 8. 褐家鼠 RnLPL (NP_036730.1); 9~10 分别为三刺鱼 GaLPL1 (XP_040040562.1), GaLPL2 (XP_040040768.1); 11. 罗非鱼 OnLPL (NP_001266682.1); 12. 草鱼 CiLPL (ACN66300.1).
Notes: The data in the upper right corner is percent identit, 1-3. CcLPLA1s (ACN66301.1), CcLPLA2a (XP_026201401.1), CcLPLBa (XP_042575005.1); 4-6. DrLPL1 (NP_571202.1), DrLPL2 (XP_002666287.3), DrLPLB (NC_007133.7); 7. HsLPL (NP_000228.1); 8. RnLPL (NP_036730.1); 9-10. GaLPL1 (XP_040040562.1), GaLPL2 (XP_040040768.1); 11. OnLPL (NP_001266682.1); 12. CiLPL (ACN66300.1).

酸序列相似性最高, 为 64.0%, 与CcLPLA2a的氨基酸相似性为 50.8%, 而 CcLPLA2a与 CcLPLA1s的相似性最低, 仅为 48.8%。

2.2 鲤 CcLPLs 基因表达

组织表达 使用 qPCR 测定 CcLPLA1s、CcLPLA2a 和 CcLPLBa 在鲤肝脏、心脏、肌肉、脂肪、脑、肠、脾脏 7 个组织中的表达水平。结果如图 2 所示, CcLPLA1s 在肝脏中的表达量最高, 显著高于其他组织, 在脾脏中的表达量最低, 显著低于其他各个组织 ($P<0.05$), 在脂肪、肌肉中的表达水平与心脏、脑、肠组织中的表达无显著性差异 ($P>0.05$), 但心脏组织中的表达量显著高于脑、肠组织 ($P<0.05$)。CcLPLA2a 在心脏与脂肪组织中的表达无显著性差异 ($P>0.05$), 但显著高

于其余各组织中的表达量 ($P<0.05$), 在脑中的表达量与脂肪、肝脏、肌肉中的表达水平无显著性差异 ($P>0.05$), 但在脂肪中的表达量显著高于肝脏和肌肉 ($P<0.05$), 在肠道和脾脏中的表达水平最低, 显著低于其他 5 个组织 ($P<0.05$)。CcLPLBa 在各个组织中的表达量都很低, 并且无显著性差异 ($P>0.05$)。另外, 在各个组织中 CcLPLA1s 的表达量显著高于 CcLPLBa ($P<0.05$), CcLPLA2a 的表达水平显著高于 CcLPLBa ($P<0.05$), 在肝脏、肌肉、肠组织中 CcLPLA1s 与 CcLPLA2a 的表达水平存在极显著差异 ($P<0.01$), 在脂肪和脾脏组织中 CcLPLA1s 的表达量显著高于 CcLPLA2a ($P<0.05$), 而在心脏和脑组织中, CcLPLA1s 与 CcLPLA2a 表达水平无显著差异 ($P>0.05$)。

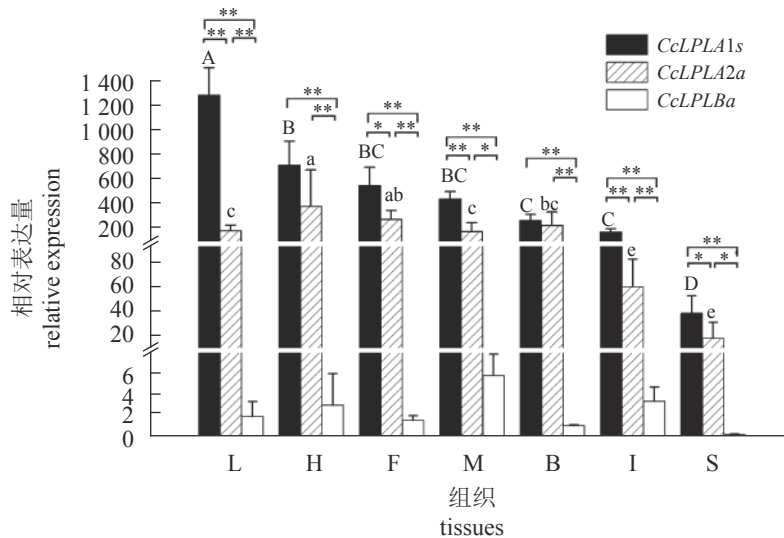


图 2 鲤 CcLPLs 组织表达

L. 肝脏, H. 心脏, F. 脂肪, M. 肌肉, B. 脑, I. 肠道, S. 脾脏; *代表组间差异显著 ($P<0.05$); **代表组间差异极显著 ($P<0.01$); 不同大写字母代表 CcLPLA1s 表达量具有显著差异 ($P<0.05$), 不同小写字母代表 CcLPLA2a 表达量具有显著差异 ($P<0.05$)。

Fig. 2 Expression of CcLPLs in various tissues in *C. carpio*

L. liver, H. heart, F. fat, M. muscle, B. brain, I. intestine, S. spleen, * represents significant difference in different groups ($P<0.05$); ** represents extremely significant difference in different groups ($P<0.01$); Different capital letters represent significant differences in CcLPLA1s expression ($P<0.05$), and different lowercase letters represent significant differences in CcLPLA2a expression ($P<0.05$).

饥饿和再投喂对 CcLPLs 表达的影响 肝脏组织中, 鲤正常摄食 24 h CcLPLA1s 和 CcLPLA2a 表达量显著高于正常摄食 1、3 和 6 h 表达量 ($P<0.05$); 饥饿状态下, CcLPLA1s 和 CcLPLA2a 表达水平无显著性差异 ($P>0.05$), 但 CcLPLA1s 的表达量显著高于正常投喂时表达量 ($P<0.05$), CcLPLA2a 显著高于正常摄食 1、3 和 6 h 的表达量; 再投喂后, CcLPLA1s 和 CcLPLA2a 的表达水平与禁食期间相比显著下降 ($P<0.05$), 再投喂

72 h 时的表达水平显著高于再投喂 54 h 的表达水平 ($P<0.05$) (图 3-a, b)。

肌肉组织中, CcLPLA1s 和 CcLPLA2a 表达量在鲤正常摄食 6 h 显著高于正常摄食 1、3 和 24 h 表达量 ($P<0.05$), 在 1、3 和 24 h 时表达水平无显著性差异 ($P>0.05$); 饥饿状态下, CcLPLA1s 和 CcLPLA2a 表达水平显著低于正常摄食 6 h 表达量 ($P<0.05$), 其余各时间点无显著性差异 ($P>0.05$); 再投喂后, CcLPLA1s 和 CcLPLA2a 表达水平迅速

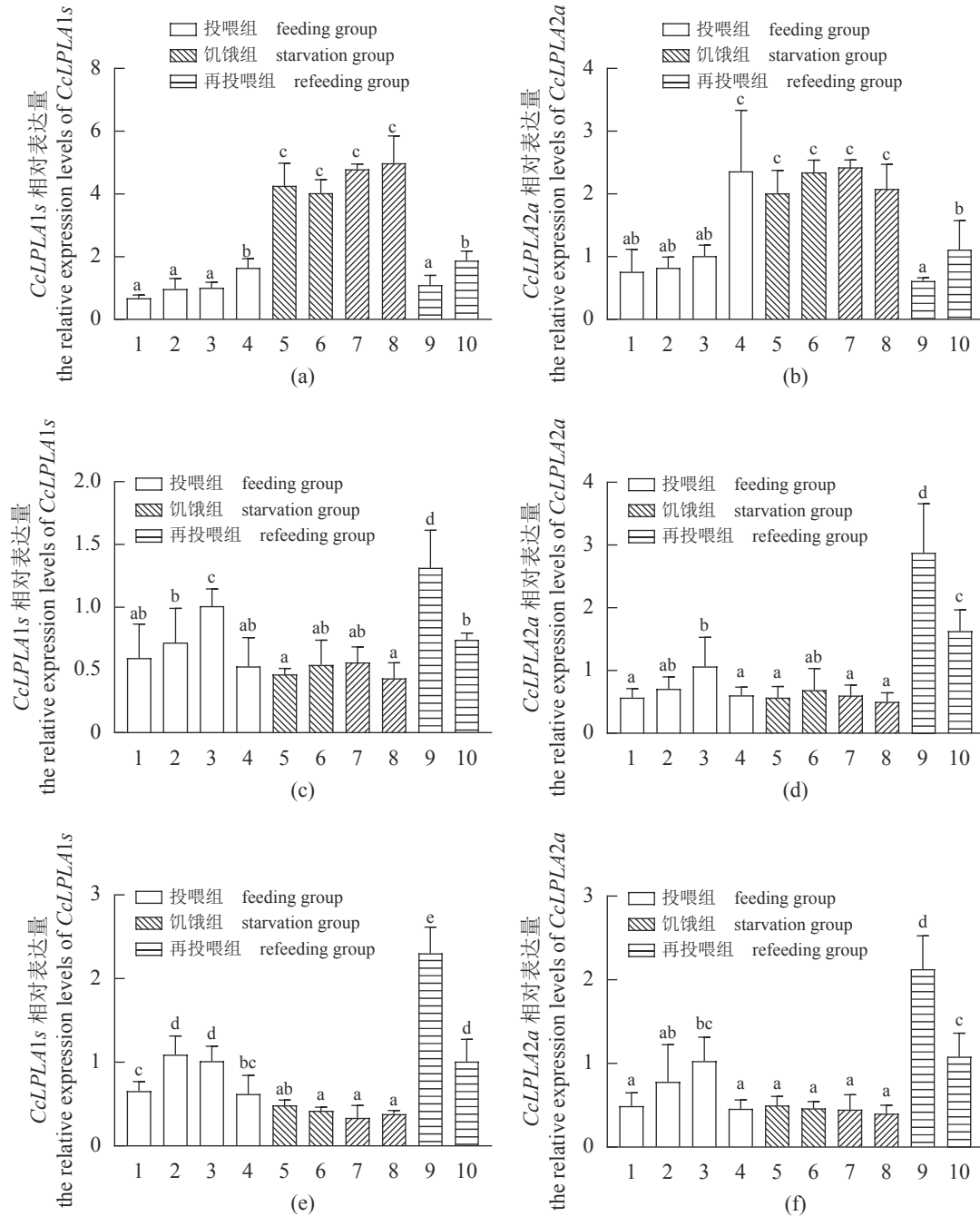


图3 饥饿和再投喂对 *CcLPLs* 表达的影响

(a)(c) 和 (e). *CcLPLA1s* 在肝脏、肌肉和脂肪组织中的表达量; (b)(d) 和 (f). *CcLPLA2a* 在肝脏、肌肉和脂肪组织中的表达量; 1~4 分别为正常摄食 1、3、6 和 24 h *CcLPLs* 表达量; 5~8 分别为饥饿 174、192、342 和 360 h *CcLPLs* 表达量; 9 和 10 分别再投喂 54 和 72 h *CcLPLs* 表达量. 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 3 Effects of starvation and refeeding on the expression of *CcLPLs*

(a) (c) and (e) are the expression levels of *CcLPLA1s* in liver, muscle and adipose tissue, respectively; (b) (d) and (f) are the expression levels of *CcLPLA2a* in liver, muscle and adipose tissue, respectively; 1-4 are the expression levels of *CcLPLs* at 1, 3, 6 and 24 h of normal feeding, respectively; 5-8 are *CcLPLs* 174, 192, 342 and 360 h, respectively; 9 and 10 are the expression levels of *CcLPLs* at 54 and 72 h after refeeding, respectively. Different lowercase letters indicate the significance of differences ($P<0.05$).

升高, 显著高于禁食期间的表达量 ($P<0.05$), 但再投喂 72 h 时, 显著低于再投喂 54 h 的表达水平 ($P<0.05$)(图 3-c, d)。

脂肪组织中, *CcLPLA1s* 表达量在鲤正常摄食 3 和 6 h 显著高于正常摄食 1 和 24 h 表达量 ($P<0.05$), 饥饿状态下的表达水平显著低于投喂组

的表达水平 ($P < 0.05$), 在饥饿期间期间各时间点表达量无显著性差异 ($P > 0.05$); *CcLPLA2a* 表达量在鲤正常摄食 6 h 显著高于正常摄食 1、3 和 24 h 及饥饿时的表达量 ($P < 0.05$), 饥饿期间各时间点的表达水平无显著性差异 ($P > 0.05$); 再投喂后, *CcLPLA1s* 和 *CcLPLA2a* 表达水平迅速升高, 显著高于饥饿组的表达量 ($P < 0.05$), 再投喂 72 h 时, 显著低于再投喂 54 h 的表达水平 ($P < 0.05$)(图 3-e, f)。

2.3 重组蛋白的表达

将成功构建的 Skp-pET、SlyD-pET、Skp-CcLPLs-pET 和 SlyD-CcLPLs-pET 质粒分别在大肠杆菌 *Transetta* (DE3) 中表达, 在 25 °C、0.1 mmol/L IPTG、180 r/min 条件下诱导 12 h 后, 将不加 IPTG 诱导的对照组与经 IPTG 诱导的总菌、上清液进行 SDS-PAGE。结果显示, 与未加 IPTG 诱导组比较, 重组蛋白 Skp-CcLPLA1a (72.46 ku)、Skp-CcLPLA2a(70.79 ku)、Skp-CcLPLBa (75.44 ku)、

SlyD-CcLPLA1a (77.62 ku)、SlyD-CcLPLA2a (75.96 ku)、SlyD-CcLPLBa (80.60 ku)、Skp (15.96 ku) 和 SlyD (21.12 ku) 在各自分子量处均有一条特异性表达的条带, 与预测条带大小一致(图 4)。使用 Image Lab 定量分析系统对目的条带进行灰度分析, 结果显示, Skp-CcLPLA1a 和 Skp-CcLPLBa 的总蛋白表达量分别比 SlyD-CcLPLA1a 和 SlyD-CcLPLBa 的总蛋白表达量高, 但 Skp-CcLPLA1a 和 Skp-CcLPLBa 的可溶性蛋白表达量分别低于 SlyD-CcLPLA1a 和 SlyD-CcLPLBa 的可溶性蛋白表达量; Skp-CcLPLA2a 和 SlyD-CcLPLA2a 总蛋白表达量相差不多, 但 Skp-CcLPLA2a 可溶性蛋白表达量高于 SlyD-CcLPLA2a 可溶性蛋白表达量。Skp-CcLPLs 可溶性蛋白占总蛋白比例从高到低依次为 Skp-CcLPLBa、Skp-CcLPLA1a 和 Skp-CcLPLA2a; SlyD-CcLPLs 可溶性蛋白占总蛋白比例从高到低依次为 SlyD-CcLPLBa、SlyD-CcLPLA1a 和 SlyD-CcLPLA2a。

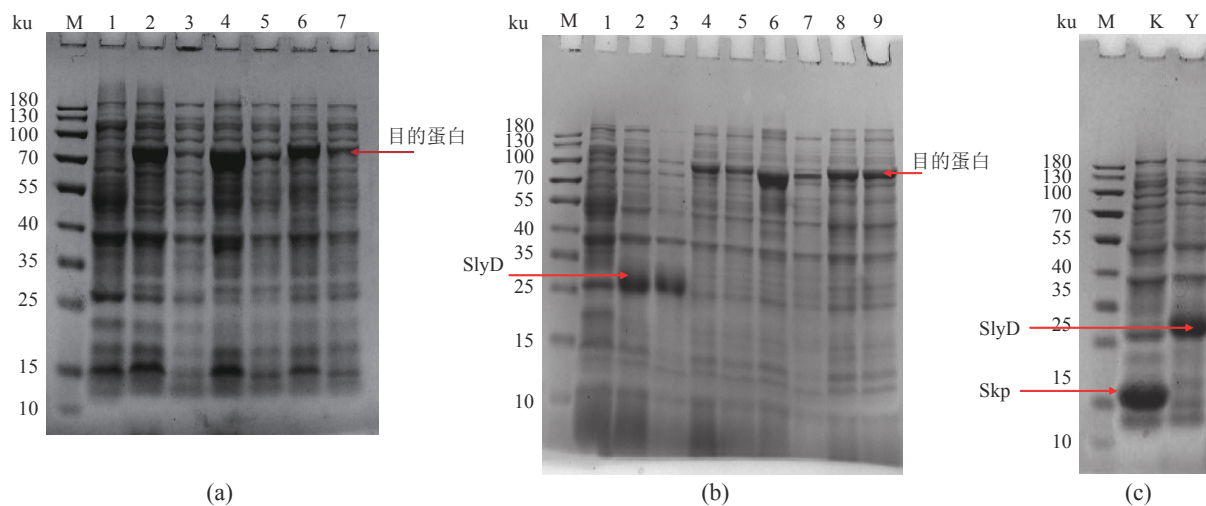


图 4 IPTG 诱导重组蛋白表达的 SDS-PAGE 检测

(a) Skp-CcLPLs 重组蛋白, M. 蛋白 Marker, 1. 对照组, 2、4、6 分别为 Skp-CcLPLA1a、Skp-CcLPLA2a、Skp-CcLPLBa 总菌, 3、5、7 分别为 Skp-CcLPLA1a、Skp-CcLPLA2a、Skp-CcLPLBa 上清液; (b) SlyD-CcLPLs 重组蛋白, 1. 对照组, 2、4、6、8 分别为 SlyD、SlyD-CcLPLA1a、SlyD-CcLPLA2a、SlyD-CcLPLBa 总菌, 3、5、7、9 分别为 SlyD、SlyD-CcLPLA1a、SlyD-CcLPLA2a、SlyD-CcLPLBa 上清液; (c) Skp、SlyD 标签蛋白, K. Skp 上清液, Y. SlyD 上清液。

Fig. 4 SDS-PAGE detection of recombinant protein expression induced by IPTG

(a) Skp-CcLPLs recombinant protein, M. protein marker; 1. control group; 2, 4, 6. Skp-CcLPLA1a, Skp-CcLPLA2a, Skp-CcLPLBa total bacteria, respectively; 3, 5, 7. Skp-CcLPLA1a, Skp-CcLPLA2a, Skp-CcLPLBa supernatant protein, respectively. (b) SlyD-CcLPLs recombinant protein, 1. control group; 2, 4, 6, 8. SlyD, SlyD-CcLPLA1a, SlyD-CcLPLA2a, SlyD-CcLPLBa total bacteria, respectively; 3, 5, 7, 9. SlyD, SlyD-CcLPLA1a, SlyD-CcLPLA2a, SlyD-CcLPLBa supernatant protein, respectively. (c) Skp, SlyD label protein; K. Skp supernatant protein; Y. SlyD supernatant protein.

2.4 重组蛋白的表达纯化及浓度确定

可溶性蛋白的纯化 可溶性蛋白的纯化将获得的上清液蛋白分别使用镍柱纯化(图 5), 重组蛋白与镍柱结合率低并有杂蛋白伴随产生。

从包涵体蛋白种纯化可溶蛋白 本实验在大肠杆菌沉淀蛋白中加入含 6 mol/L 尿素的裂解液, 轻轻摇匀后, 溶液变得澄清透明, 低温离心, 留上清液, 使用 0.22 μm 滤膜过滤后, 通过镍柱

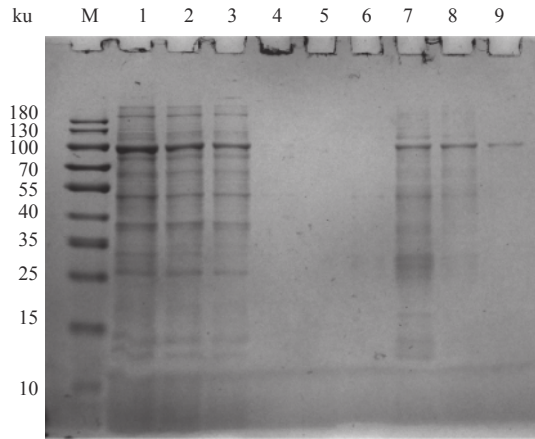


图5 可溶蛋白的纯化

M. 蛋白 Marker, 1. SlyD-CcLPLBa 上清液, 2. 穿流液, 3. 不加咪唑洗涤液, 4~6. 2 mmol/L 咪唑洗涤液, 7~9. 50 mmol/L 咪唑洗脱液。

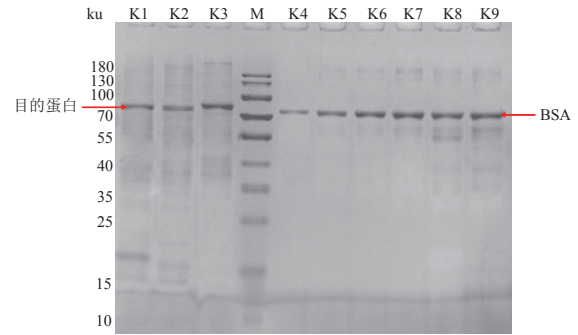
Fig. 5 Purification of soluble proteins

M. protein Marker; 1. SlyD-CcLPLBa supernatant; 2. permeate; 3. washing without imidazole; 4-6. washing with 2 mmol/L imidazole; 7-9. washing with 50 mmol/L. imidazole.

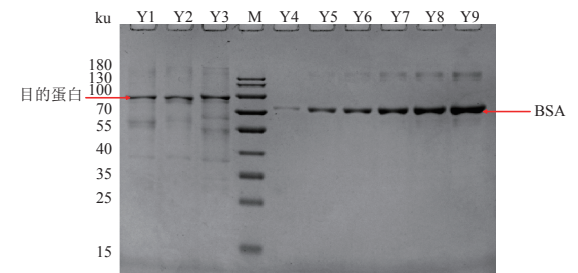
纯化, 并直接使用含不同浓度咪唑的非变性裂解液进行目的蛋白的洗脱。结果显示, 分别获得了较高纯度的重组蛋白(图6)。采用BSA法对蛋白浓度进行确定, 经SDS-PAGE蛋白电泳检测, 结果显示, 每获得1g总菌可以从其包涵体中获得纯化的重组蛋白量从高到低依次为SlyD、Skp、SlyD-CcLPLBa、Skp-CcLPLBa、SlyD-CcLPLA1a、Skp-CcLPLA1a、SlyD-CcLPLA2a和Skp-CcLPLA2a, 质量分别为0.62、0.60、0.49、0.44、0.31、0.24、0.16和0.12 mg。

2.5 三种CcLPLs重组蛋白的脂蛋白脂肪酶活性测定

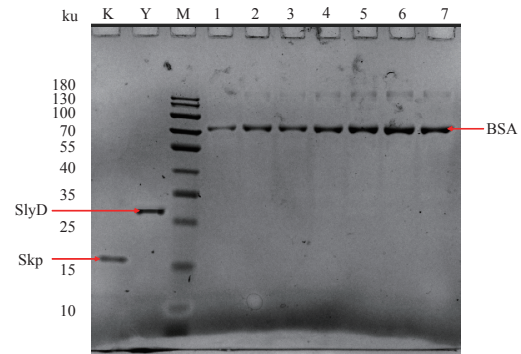
实验对Skp、SlyD 2种标签蛋白和3种CcLPLs重组蛋白进行脂肪酶活性测定, 结果显示, Skp和SlyD均没有脂蛋白脂肪酶活性, 而Skp-CcLPLs和SlyD-CcLPLs脂蛋白脂肪酶活性各不相同(图7)。3种CcLPLs重组蛋白的脂蛋白脂肪酶比活力从高到低依次为SlyD-CcLPLA1a、Skp-CcLPLA1a、Skp-CcLPLBa、Skp-CcLPLA2a、SlyD-CcLPLBa和SlyD-CcLPLA2a, 分别为(24.12±0.96)、(22.66±0.46)、(21.48±0.47)、(21.13±0.46)、(18.07±0.39)和(16.49±0.31) U/g。其中, Skp-CcLPLA1a的脂蛋白脂肪酶活性显著高于Skp-CcLPLA2a酶活性($P<0.05$), 而Skp-CcLPLBa与Skp-CcLPLA1a、Skp-CcLPLA2a酶活性均无显著性差异($P>0.05$); SlyD-CcLPLA1a酶活性显著高于SlyD-CcLPLBa



(a)



(b)



(c)

图6 重组蛋白浓度确定

(a) Skp-CcLPLs 蛋白, M. 蛋白 Marker, K1. Skp-CcLPLA1a, K2. Skp-CcLPLA2a, K3. Skp-CcLPLBa; K4-K9 为 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 和 30.0 μg BSA 蛋白。(b) SlyD-CcLPLs 蛋白, Y1. SlyD-CcLPLA1a, Y2. SlyD-CcLPLA2a, Y3. SlyD-CcLPLBa; Y4-Y9 分别为 3.75、5.0、10.0、15.0、20.0 和 25.0 μg BSA 蛋白。(c) K. Skp, Y. SlyD, 1~7 分别为 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0 和 35.0 μg BSA 蛋白。

Fig. 6 Recombinant protein concentration determination

(a) Skp-CcLPLs protein, M. protein Marker, K1. Skp-CcLPLA1a, K2. Skp-CcLPLA2a, K3. Skp-CcLPLBa, K4-K9. 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0 μg BSA protein, respectively. (b) SlyD-CcLPLs protein, Y1. SlyD-CcLPLA1a, Y2. SlyD-CcLPLA2a, Y3. SlyD-CcLPLBa; Y4-Y9. 3.75 μg, 5.0 μg, 10.0 μg, 15.0 μg, 20.0 μg, 25.0 μg BSA protein, respectively. (c) K. Skp, Y. SlyD, 1-7. 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0 μg BSA protein, respectively.

($P<0.05$), 且SlyD-CcLPLBa的酶活性显著高于SlyD-CcLPLA2a酶活性($P<0.05$)。Skp、SlyD对同

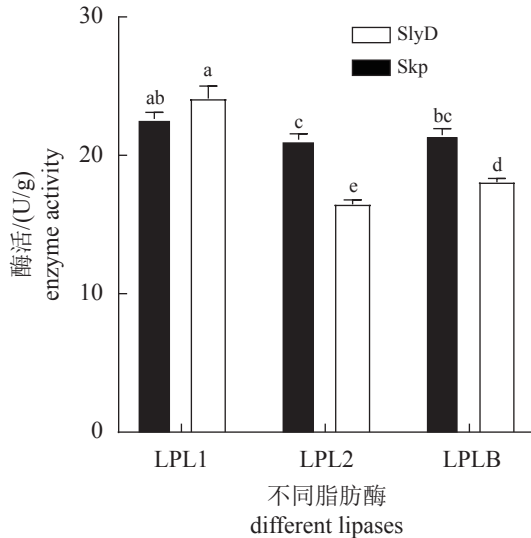


图7 Skp-CcLPLs和SlyD-CcLPLs脂蛋白脂肪酶活性测定

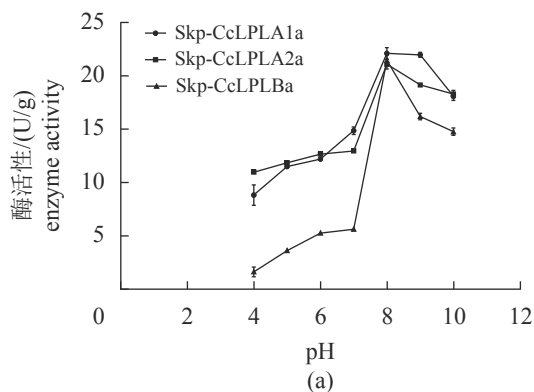
不同大写字母表示 SlyD-CcLPLs 蛋白酶活性具有显著性差异 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示 Skp-CcLPLs 蛋白酶活性具有显著性差异 ($P < 0.05$), *表示 Skp 和 SlyD 对同一蛋白酶活性具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 7 Determination of lipoprotein lipase activity of Skp-CcLPLs and SlyD-CcLPLs

Different capital letters represent significant differences in SlyD-CcLPLs enzyme activities ($P < 0.05$), different lowercase letters represent significant differences in Skp-CcLPLs enzyme activities ($P < 0.05$), and * represent significant differences in Skp-CcLPLs and SlyD-CcLPLs enzyme activities ($P < 0.05$).

一种脂蛋白脂肪酶活性的影响也不同, Skp-CcLPLA1a 与 SlyD-CcLPLA1a 脂蛋白脂肪酶活性没有显著性差异 ($P > 0.05$), 而 Skp-CcLPLA2a、Skp-CcLPLBa 脂蛋白脂肪酶活性分别显著高于 SlyD-CcLPLA2a 和 SlyD-CcLPLBa 的活性 ($P < 0.05$)。

2.6 pH 对三种 CcLPLs 重组蛋白的脂蛋白脂



肪酶活性影响

pH 4.0~10.0 范围内测定 3 种 CcLPLs 重组蛋白的脂蛋白脂肪酶活性 (图 8), Skp-CcLPLs 和 SlyD-CcLPLs 脂蛋白脂肪酶活性最适 pH 均为 8.0。

2.7 NaCl 对三种 CcLPLs 重组蛋白的脂蛋白脂肪酶活性影响

实验设置了 0~1.5 mol/L NaCl 浓度, 测定 NaCl 对 3 种 CcLPLs 重组蛋白的脂蛋白脂肪酶活性的影响, 结果见图 9。NaCl 浓度在 0~0.6 mol/L 范围内, Skp-CcLPLs 和 SlyD-CcLPLs 脂蛋白脂肪酶活性逐渐升高, NaCl 浓度在 0.7、1.0 和 1.5 mol/L 时, Skp-CcLPLs 和 SlyD-CcLPLs 酶活性受到抑制。

2.8 三种 CcLPLs 重组蛋白酶促动力学

以 p-NPP 为底物, 30 °C, pH 8.0 条件下测定 3 种 CcLPLs 重组蛋白与不同浓度的底物反应的吸光值, 根据实验得到的数据计算后进行线性拟合, 以 p-NPP 底物浓度为横坐标, 以反应速率 V 为纵坐标, 作米氏方程曲线图 (图 10)。Skp-CcLPLs、SlyD-CcLPLs 脂蛋白脂肪酶活性随着 p-NPP 底物浓度的增加而不断增大, 直到 p-NPP 底物浓度增加至 1.0 mmol/L 时, Skp-CcLPLs、SlyD-CcLPLs 脂蛋白脂肪酶活性分别达到最大。各重组蛋白的 K_m 值及 V_{max} 见表 4。

3 讨论

3.1 鲤 CcLPLs 基因

鲤是典型的四倍体鱼类^[36], 本实验在鲤基因组中挖掘到了 5 个 CcLPLs 基因 (CcLPLA1a、

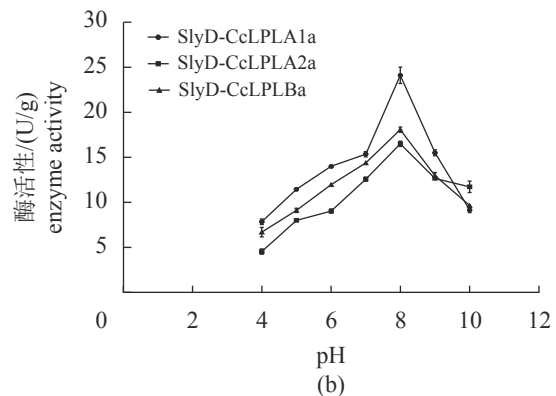


图8 pH 对 Skp-CcLPLs (a) 和 SlyD-CcLPLs (b) 脂蛋白脂肪酶活性的影响

Fig. 8 Effects of pH on the lipoprotein lipase activities of Skp-CcLPLs (a) and SlyD-CcLPLs (b)

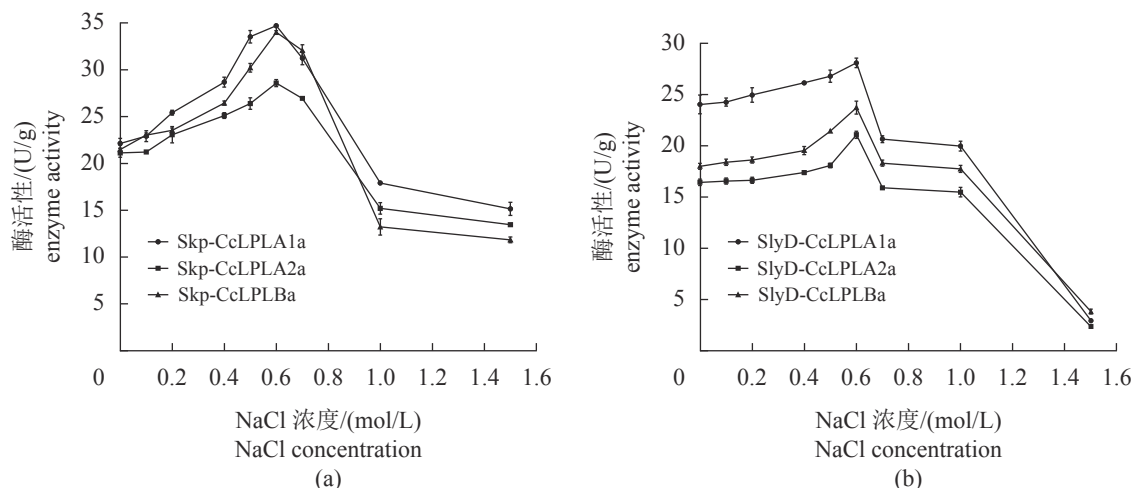


图9 NaCl对Skp-CcLPLs (a)和SlyD-CcLPLs (b)脂蛋白脂肪酶活性的影响

Fig. 9 Effects of NaCl on the lipoprotein lipase activities of Skp-CcLPLs (a) and SlyD-CcLPLs (b)

CcLPLA1b、*CcLPLA2a*、*CcLPLA2b**和*CcLPLBa*), 其中*CcLPLA2b**是假基因, 这与同源基因在进化过程中会产生功能变化、表达调控变化及成为假基因的报道一致^[37]。共线性分析揭示了染色体在加倍过程中出现了基因的丢失, 3R鱼类经FSGD后, 在斑马鱼、斑点叉尾鲷、墨西哥丽脂鲤和电鳗连锁群上均找到了*LPL1*、*LPL2*和*LPLB* 3种同源基因, 但在罗非鱼和青鲮鱼中未找到*LPLB*基因, 基因丢失现象在植物中也有过报道^[38]。鲤经CcSGD后也发现了3种*CcLPLs*同源基因, 其中*CcLPLA1*和*CcLPLA2*均存在2个旁基因, 理论上*CcLPLB*应该也存在2个旁基因, 但实验只发现了一条连锁群上存在*CcLPLBa*基因, 关于另一条连锁群上是否存在*CcLPLB*的旁基因还有待进一步研究。

3.2 鲤*CcLPLs*组织表达

qPCR结果显示, *CcLPLA1s*、*CcLPLA2a*和*CcLPLBa*在鲤肝脏、心脏、肌肉、脂肪、脑、肠、脾脏7个组织中均有表达, 但不同组织中的表达水平存在显著差异, 在肝脏、心脏、脂肪、肌肉组织中的表达量较高, 而在脾脏中的表达量较低, 与刀鲚(*Coilia nasus*)^[17]、彭泽鲫(*Carassius auratus*)^[39]、斑马鱼^[40]等*LPL*基因在多种组织中表达水平类似, 表明了鲤*LPLs*具有组织表达特异性。本研究中*CcLPLs*在肝脏中有大量的表达, 这与草鱼^[15]、花鲈(*Lateolabrax maculatus*)^[19]等鱼类中肝脏*LPL*有较高表达水平结果一致, 但与成年哺乳动物肝脏*LPL*低表达结果恰好相反^[41], 这可能

与肝脏是鱼类储存脂肪的重要组织有关^[42]。同源基因在进化过程中存在表达模式差异^[37], 在不同组织中, *CcLPLA1s*、*CcLPLA2a*和*CcLPLBa*的表达水平存在差异, 推测3种*CcLPLs*在功能方面可能存在差异。

3.3 饥饿和再投喂对*CcLPLs*表达的影响

研究表明, 鱼类可以通过摄食控制各组织*LPL*表达水平的高低来决定各组织脂质代谢底物的分配量, *LPL*的合成和分泌受到底物量的影响^[43]。肝脏、肌肉、脂肪被认为是硬骨鱼类脂肪储存的重要组织^[42-44], 因此, 本实验测定了鲤正常投喂、饥饿和再投喂后*CcLPLA1s*和*CcLPLA2a*在肝脏、脂肪、肌肉的表达水平。与正常投喂组相比, 饥饿组, *CcLPLA1s*和*CcLPLA2a*在肝脏中的表达量显著升高, 真鲷^[21]、罗非鱼^[45]等饥饿后, 肝脏中*LPL*的表达水平也明显上调, 可能是鱼类受到饥饿后, 肝脏脂质被用来为机体提供能量。鲤经再投喂后, *CcLPLA1s*和*CcLPLA2a*在肝脏中的表达量迅速下降至与正常摄食组无显著差异, Oku等^[21]对在真鲷再投喂6h, 肝脏*LPL*表达水平至正常投喂组的水平, 本实验的发现与Oku等^[21]研究结果类似, 说明重投喂抑制了因饥饿引起的肝脏中脂质的分解并获得了脂质的补充。与投喂组相比, 鲤在受到饥饿后, *CcLPLA1s*和*CcLPLA2a*在肌肉组织和脂肪组织中的表达水平呈现下降趋势, 但在再投喂后, 肌肉和脂肪组织中*CcLPLA1s*和*CcLPLA2a*的表达水平显著升高, 在再投喂72h后, 再次下降, 表明鲤重摄食后, 营养得到了补

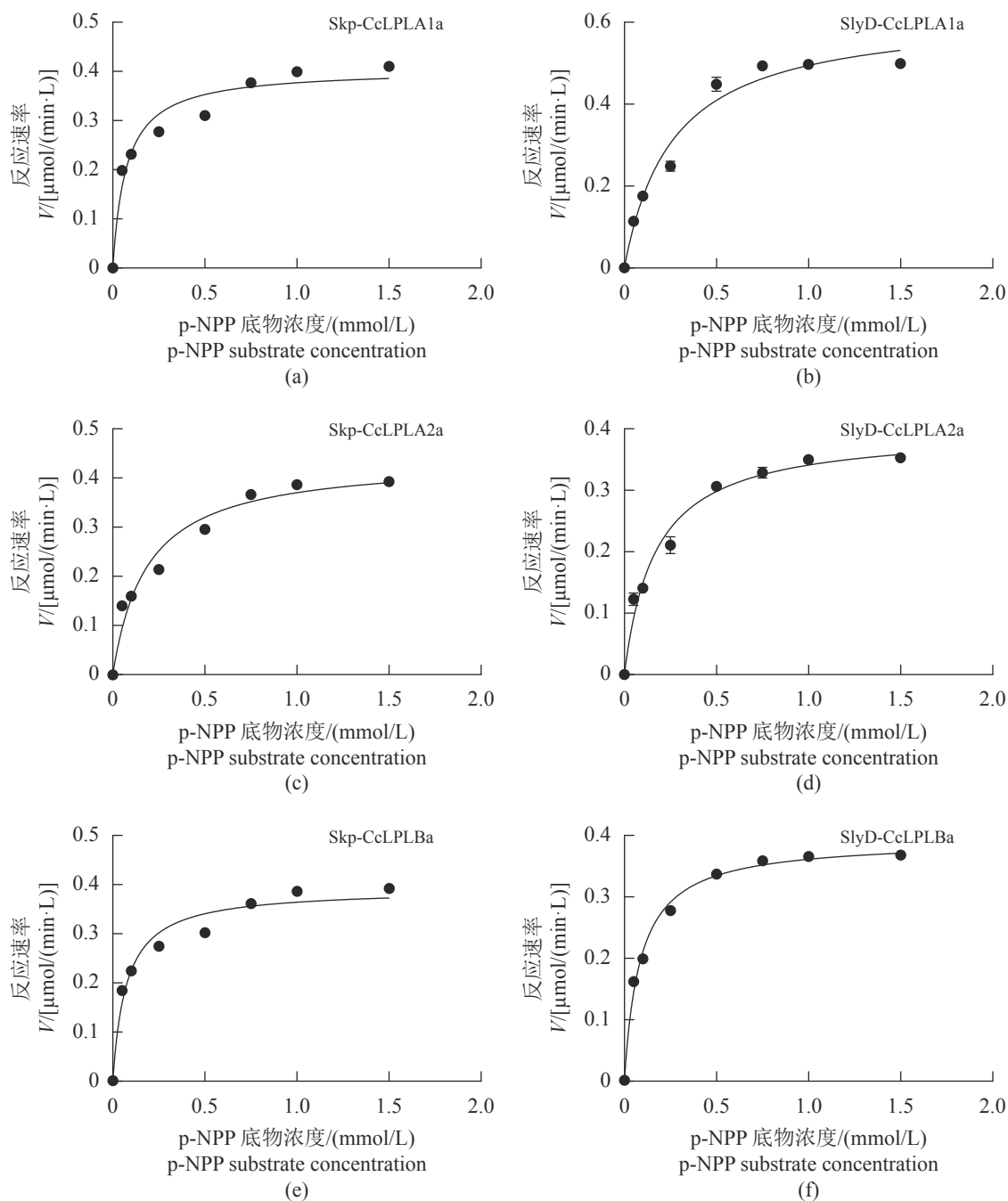


图 10 p-NPP 底物浓度对酶促反应速率的影响

Fig. 10 Effects of p-NPP substrate concentrations on the enzymatic reaction rate

充, 促使鱼体各项生理机能得到了恢复。

3.4 重组蛋白的表达及纯化

大肠杆菌原核表达是真核基因在体外获得蛋白常用方式^[46], 但是获得的蛋白往往是无活性的包涵体。研究表明, Skp 和 SlyD 具有分子伴侣的功能^[47-48], 能够促进蛋白的正确折叠^[28, 32], 本实验对 pET43.1a 原核载体进行了改造, 在该载体中分

别插入了 *skp* 和 *slyD* 基因, 构建了 Skp-pET 和 SlyD-pET 原核促溶载体, 分别将目的基因 CcLPLs 插入到 Skp-pET 和 SlyD-pET 载体上, 在最适诱导条件下获得 CcLPLs 重组蛋白, 结果显示, Skp 和 SlyD 均能促进 CcLPLs 的可溶性表达, 这意味着 Skp 和 SlyD 能够有效地促进 CcLPLs 蛋白质的正确折叠, 且 SlyD 对 CcLPLA1a 和 CcLPLBa 的促溶效果好, 而 Skp 对 CcLPLA2a 的促溶效果则更好,

表 4 酶动力学常数

Tab. 4 Enzyme kinetic constant

重组蛋白 recombinant protein	K_m /(mmol/L)	V_{max} /[$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{L})$]
Skp-CcLPLA1a	0.073 1	4.044
Skp-CcLPLA2a	0.185 7	4.394
Skp-CcLPLBa	0.074 3	3.901
SlyD-CcLPLA1a	0.263 9	6.244
SlyD-CcLPLA2a	0.168 9	3.989
SlyD-CcLPLBa	0.087 3	3.915

Lee 等^[49]曾探究了泛素 (ubiquitin, Ub)、硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx)、大肠杆菌麦芽糖结合蛋白 (maltose binding protein, MBP) 和 NusA 4 种不同的标签蛋白对人肾素结合蛋白 (human renin binding protein, hRnBP) 促溶效果, 结果显示, 只有 MBP 和 Trx 能够促进 hRnBP 的可溶性表达, 且 MBP 的促溶效果明显高于 Trx, 这与本实验结果相似, 表明了不同标签蛋白对同一目的蛋白的促溶效果不同。获得可溶性蛋白后, 实验首先对可溶性的蛋白使用镍柱进行纯化, 但纯化不到目的蛋白, 推测是 6His 结构包裹到了重组蛋白的内部^[50]。考虑到 Skp 和 SlyD 的促溶作用, 实验又对包涵体蛋白进行了变性处理, 将变性后的上清液直接挂镍柱, 然后通过不含咪唑裂解液进行洗脱目的蛋白, 结果获得了较高纯度的目的蛋白, Rashid 等^[51]报道, β -丙氨酸、二甲基亚砷 (DMSO) 和乙二醇化学伴侣能够重新激活尿素变性的二氢叶酸还原酶 (zebrafish dihydrofolate reductase, zDHFR), 该结果与本实验的结果类似, 推测 Skp 和 SlyD 具有辅助变性蛋白复性的作用。

3.5 三种 CcLPLs 重组蛋白的脂蛋白脂肪酶活性

本实验使用对硝基苯酚法测定各重组蛋白的酶活性, 结果 Skp-CcLPLA2a 和 Skp-CcLPLBa 均显著高于 SlyD-CcLPLA2a 和 SlyD-CcLPLBa 的脂蛋白脂肪酶活性, 推测 Skp 和 SlyD 与鲤 CcLPLs 会发生相互作用, 进而影响了 CcLPLs 酶的活性^[52]。pH 是影响脂肪酶活性的一个重要因素^[53], 本实验测定的各重组蛋白的最适是 pH 8.0, 与鲜牛乳中 LPL 最适 pH 为 8.0~8.5 结果一致^[54], 推测脂蛋白脂肪酶在偏碱性条件下可以发挥其最大的催化活性。研究表明, NaCl 对脂蛋白脂肪酶活性有影

响^[55-56]。适宜浓度的 NaCl 可以用来保持 LPL 的活性, 而过高的 NaCl 浓度则会抑制 LPL 的活性^[54]。Bengtsson-Olivercrona 等^[55]的研究表明脂蛋白脂肪酶在 0.5 mol/L NaCl 中比在 0.1 mol/L NaCl 中的活性高, 高浓度 NaCl 中酶活受到抑制; Vilaró 等^[57]对高浓度 NaCl 能够抑制脂蛋白脂肪酶活性进行了报道, 1.5 mol/L NaCl 可以高度抑制大鼠脂肪组织中 LPL 的活性。在本实验中也得到了类似的结果, 低浓度 NaCl 中 (0~0.6 mol/L), 3 种 CcLPLs 重组蛋白的脂蛋白脂肪酶活性逐渐升高, 而高浓度 NaCl 中 (1.0 和 1.5 mol/L), Skp-CcLPLs 和 SlyD-CcLPLs 酶活受到明显抑制, 说明 NaCl 浓度为 0.6 mol/L 时, 3 种 CcLPLs 能发挥最大活性。

综上, 本实验结果表明, 硬骨鱼类 LPL 基因在 FSGD 过程中存在丢失; qPCR 结果表明, CcLPLs 在各个组织中均有表达, 且在肝脏、心脏、肌肉、脂肪中表达量显著高于其他组织, CcLPLA1s 和 CcLPLA2a 的表达量显著高于 CcLPLBa; 饥饿会导致鲤 CcLPLA1s 和 CcLPLA2a 在肝脏中的表达水平升高, 在肌肉和脂肪中的表达水平降低, 再投喂后 CcLPLA1s 和 CcLPLA2a 的表达水平得到恢复; 重组 CcLPLs 蛋白的酶活性从高到低依次为 CcLPLA1a、CcLPLBa 和 CcLPLA2a, 最适 pH 为 8.0, 能够发挥最大活性的 NaCl 浓度为 0.6 mol/L。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Young S G, Fong L G, Beigneux A P, et al. GPIHBP1 and lipoprotein lipase, partners in plasma triglyceride metabolism[J]. *Cell Metabolism*, 2019, 30(1): 51-65.
- [2] Hahn P F. Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin[J]. *Science*, 1943, 98(2531): 19-20.
- [3] Korn E D, Quigley T W Jr. Studies on lipoprotein lipase of rat heart and adipose tissue[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1955, 18: 143-145.
- [4] Scanu A. Serum high-density lipoprotein: effect of change in structure on activity of chicken adipose tissue lipase[J]. *Science*, 1966, 153(3736): 640-641.
- [5] Wion K L, Kirchgessner T G, Lusis A J, et al. Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence[J]. *Science*, 1987, 235(4796): 1638-1641.

- [6] Wong H, Davis R C, Thuren T, *et al.* Lipoprotein lipase domain function[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(14): 10319-10323.
- [7] Wang J Y, Xian X D, Huang W, *et al.* Expression of LPL in endothelial-intact artery results in lipid deposition and vascular cell adhesion molecule-1 upregulation in both LPL and ApoE-deficient mice[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2007, 27(1): 197-203.
- [8] Gotoda T. Genetic basis of primary hypertriglyceridemia[J]. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 2013, 71(9): 1558-1564.
- [9] McLean A G, Petersons C J, Hooper A J, *et al.* Extreme diabetic lipaemia associated with a novel lipoprotein lipase gene mutation[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2009, 406(1-2): 167-169.
- [10] Pei C, Jou Y S, Fann C S J, *et al.* Lipoprotein lipase variants associated with an endophenotype of hypertension: hypertension combined with elevated triglycerides[J]. *Human Mutation*, 2009, 30(1): 49-55.
- [11] Arnault F, Etienne J, Noé L, *et al.* Human lipoprotein lipase last exon is not translated, in contrast to lower vertebrates[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, 43(2): 109-115.
- [12] Oku H, Ogata H Y, Liang X F. Organization of the lipoprotein lipase gene of red sea bream *Pagrus major*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 131(4): 775-785.
- [13] Lindberg A, Olivecrona G. Lipoprotein lipase from rainbow trout differs in several respects from the enzyme in mammals[J]. *Gene*, 2002, 292(1-2): 213-223.
- [14] Saera-Vila A, Calduch-Giner J A, Gómez-Requeni P, *et al.* Molecular characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) lipoprotein lipase. Transcriptional regulation by season and nutritional condition in skeletal muscle and fat storage tissues[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 142(2): 224-232.
- [15] Cheng H L, Meng X P, Sun S P, *et al.* Cloning and expression analysis of a cDNA encoding lipoprotein lipase from the liver of adult grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Aquaculture Research*, 2009, 40(16): 1838-1848.
- [16] Cheng H L, Sun S P, Peng Y X, *et al.* cDNA sequence and tissues expression analysis of lipoprotein lipase from common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian)[J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(6): 2665-2673.
- [17] Wang M Y, Xu D P, Liu K, *et al.* Molecular cloning and expression analysis on LPL of *Coilia nasus*[J]. *Gene*, 2016, 583(2): 147-159.
- [18] José Ibáñez A, Peinado-Onsurbe J, Sánchez E, *et al.* Lipoprotein lipase (LPL) is highly expressed and active in the ovary of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), during gonadal development[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 150(3): 347-354.
- [19] Huang H L, Zhang Y, Cao M Y, *et al.* Effects of fasting on the activities and mRNA expression levels of lipoprotein lipase (LPL), hormone-sensitive lipase (HSL) and fatty acid synthetase (FAS) in spotted seabass *Lateolabrax maculatus*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2018, 44(1): 387-400.
- [20] Conant G C. The lasting after-effects of an ancient polyploidy on the genomes of teleosts[J]. *PLoS ONE*, 2020, 15(4): e0231356.
- [21] Oku H, Koizumi N, Okumura T, *et al.* Molecular characterization of lipoprotein lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase genes: effects of fasting and refeeding on their gene expression in red sea bream *Pagrus major*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 145(2): 168-178.
- [22] Kaneko G, Yamada T, Han Y N, *et al.* Differences in lipid distribution and expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and lipoprotein lipase genes in torafugu and red seabream[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 184: 51-60.
- [23] Ryu Y W, Tanaka R, Kasahara A, *et al.* Molecular cloning and transcript expression of genes encoding two types of lipoprotein lipase in the ovary of cutthroat trout, *Oncorhynchus clarki*[J]. *Zoological Science*, 2013, 30(3): 224-237.
- [24] Wang L, Kaneko G, Takahashi S I, *et al.* Identification and gene expression profile analysis of a major type of lipoprotein lipase in adult medaka *Oryzias latipes*[J]. *Fisheries Science*, 2015, 81(1): 163-173.
- [25] Bassham S, Cañestro C, Postlethwait J H. Evolution of

- developmental roles of Pax2/5/8 paralogs after independent duplication in urochordate and vertebrate lineages[J]. *BMC Biology*, 2008, 6: 35.
- [26] Zayed M, Badawi M A. In-Silico evaluation of a new gene from wheat reveals the divergent evolution of the CAP160 homologous genes into monocots[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2020, 88(2): 151-163.
- [27] Peng Z, Cheng H, Sun G F, *et al.* Expression patterns and functional divergence of homologous genes accompanied by polyploidization in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Science China Life Sciences*, 2020, 63(10): 1565-1579.
- [28] Bui L M, Galdi A, Nguyen T T, *et al.* mRNA engineering for the efficient chaperone-mediated co-translational folding of recombinant proteins in *Escherichia coli* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(13): 3163.
- [29] Bakhtiarvand B, Sadeghi Z, Tarahomjoo S, *et al.* Chaperones promote remarkable solubilization of *Salmonella enterica* serovar enteritidis flagellin expressed in *Escherichia coli* [J]. *Protein & Peptide Letters*, 2020, 27(3): 210-218.
- [30] Smith C L, Econome J G, Schutt A, *et al.* A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome [J]. *Science*, 1987, 236(4807): 1448-1453.
- [31] Schäfer U, Beck K, Müller M. Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(35): 24567-24574.
- [32] Quistgaard E M, Weininger U, Ural-Blimke Y, *et al.* Molecular insights into substrate recognition and catalytic mechanism of the chaperone and FKBP peptidyl-prolyl isomerase SlyD [J]. *BMC Biology*, 2016, 14(1): 82.
- [33] Geitner A J, Weininger U, Paulsen H, *et al.* Structure-based insights into the dynamics and function of two-domain SlpA from *Escherichia coli* [J]. *Biochemistry*, 2017, 56(50): 6533-6543.
- [34] Louis A, Muffato M, Crollius H R. Genomicus: five genome browsers for comparative genomics in eukaryota [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D700-D705.
- [35] 周杰, 俞菊华, 李红霞, 等. 鲤鱼2种脂蛋白脂肪酶基因的cDNA克隆、表达及其酶活性 [J]. *江苏农业学报*, 2016, 32(2): 414-423.
- Zhou J, Yu J H, Li H X, *et al.* Cloning and expression of two genes encoding lipoprotein lipase of *Cyprinus carpio* [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 32(2): 414-423 (in Chinese).
- [36] Chen L, Dong C J, Kong S N, *et al.* Genome wide identification, phylogeny, and expression of bone morphogenetic protein genes in tetraploidized common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Gene*, 2017, 627: 157-163.
- [37] Balakirev E S, Ayala F J. Pseudogenes: are they "Junk" or functional DNA? [J]. *Annual Review of Genetics*, 2003, 37(1): 123-151.
- [38] Wendel J F, Lisch D, Hu G J, *et al.* The long and short of doubling down: polyploidy, epigenetics, and the temporal dynamics of genome fractionation [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2018, 49: 1-7.
- [39] Cheng H L, Wang X, Peng Y X, *et al.* Molecular cloning and tissue distribution of lipoprotein lipase full-length cDNA from Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 153(1): 109-115.
- [40] Feng D, Huang Q Y, Liu K, *et al.* Comparative studies of zebrafish *Danio rerio* lipoprotein lipase (*lpl*) and hepatic lipase (*lipc*) genes belonging to the lipase gene family: evolution and expression pattern [J]. *Journal of Fish Biology*, 2014, 85(2): 329-342.
- [41] Schoonjans K, Staels B, Devos P, *et al.* Developmental extinction of liver lipoprotein lipase mRNA expression might be regulated by an NF-1-like site [J]. *FEBS Letters*, 1993, 329(1-2): 89-95.
- [42] Hemre G I, Mommsen T P, Krogdahl Å. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2002, 8(3): 175-194.
- [43] 王钦, 李建林, 唐永凯, 等. 饥饿和重摄食对鲤鱼脂蛋白脂肪酶活性的影响 [J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2019, 45(1): 82-85.
- Wang Q, Li J L, Tang Y K, *et al.* Effects of starvation and refeeding on activities of lipoprotein lipase in *Cyprinus carpio* [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2019, 45(1): 82-85 (in Chinese).
- [44] Flynn E J, Trent C M, Rawls J F. Ontogeny and nutri-

- tional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Journal of Lipid Research*, 2009, 50(8): 1641-1652.
- [45] Han C Y, Wen X B, Zheng Q M, *et al.* Effect of starvation on activities and mRNA expression of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2011, 37(1): 113-122.
- [46] Kesidis A, Depping P, Lodé A, *et al.* Expression of eukaryotic membrane proteins in eukaryotic and prokaryotic hosts[J]. *Methods*, 2020, 180: 3-18.
- [47] Burmann B M, Holdbrook D A, Callon M, *et al.* Revisiting the interaction between the chaperone Skp and lipopolysaccharide[J]. *Biophysical Journal*, 2015, 108(6): 1516-1526.
- [48] Kovermann M, Schmid F X, Balbach J. Molecular function of the prolyl *cis/trans* isomerase and metallochaperone SlyD[J]. *Biological Chemistry*, 2013, 394(8): 965-975.
- [49] Lee C, Lee S G, Takahashi S, *et al.* The soluble expression of the human renin binding protein using fusion partners: a comparison of ubiquitin, thioredoxin, maltose binding protein and NusA[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 8(2): 89-93.
- [50] Spriestersbach A, Kubicek J, Schäfer F, *et al.* Purification of his-tagged proteins[J]. *Methods in Enzymology*, 2015, 559: 1-15.
- [51] Rashid N, Thapliyal C, Chaudhuri P. Quantification of differential efficacy of chemical chaperones in ameliorating solubilization and folding of zebrafish dihydrofolate reductase[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 111: 186-192.
- [52] Faust O, Abayev-Avraham M, Wentink A S, *et al.* HSP40 proteins use class-specific regulation to drive HSP70 functional diversity[J]. *Nature*, 2020, 587(7834): 489-494.
- [53] Moyano F J, Díaz M, Alarcón F J, *et al.* Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1996, 15(2): 121-130.
- [54] Bengtsson G, Olivecrona T. The effects of pH and salt on the lipid binding and enzyme activity of lipoprotein lipase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1983, 751(2): 254-259.
- [55] Bengtsson-Olivecrona G, Olivecrona T. Binding of active and inactive forms of lipoprotein lipase to heparin. Effects of pH[J]. *Biochemical Journal*, 1985, 226(2): 409-413.
- [56] Quig D W, Layman D K, Bechtel P J, *et al.* The influence of starvation and refeeding on the lipoprotein lipase activity of skeletal muscle and adipose tissue of lean and obese Zucker rats[J]. *The Journal of Nutrition*, 1983, 113(6): 1150-1156.
- [57] Vilaró S, Testar X, Ramírez I, *et al.* Lipoprotein lipase activity in the liver of starved pregnant rats[J]. *Biology of the Neonate*, 1990, 57(1): 37-45.

Characteristics, gene expression, recombinant protein expression and enzyme activity of lipoprotein lipase in *Cyprinus carpio*

WANG Yujing¹, FENG Wenrong^{1,2}, XU Yuxin¹, LI Jianlin^{1,2},
SU Shengyan^{1,2}, YU Juhua^{1,2}, TANG Yongkai^{1,2*}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214128, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Lipoprotein lipase (LPL) is a key enzyme in fat hydrolysis. In order to study the gene characteristics, temporal and spatial expression distribution and enzyme activity of *Cyprinus carpio* LPLs (*CcLPLs*), the homologous genes of *CcLPLs* were obtained by homology searches through *C. carpio* genome and the sequence characteristics were analyzed. The expression analysis of *CcLPLs* in different tissues was carried out by qPCR. *CcLPLs* recombinant protein were obtained by prokaryotic expression system, and the enzyme activity of recombinant proteins was determined by p-nitrophenol method. The results are as follows. Five *CcLPLs* homologous genes (*CcLPLA1a*, *CcLPLA1b*, *CcLPLA2a*, *CcLPLA2b** and *CcLPLBa*) were excavated from the carp genome, of which *CcLPLA2b** is a pseudogene. The collinearity analysis showed that gene loss occurred during the doubling of the fish-specific genome, while the doubling of the carp-specific genome resulted in the presence of five *CcLPLs* in carp. By Homology analysis, *CcLPLBa* shared 64% identity with *CcLPLA1s* and 50.8% with *CcLPLA2a*. qPCR showed that the expression of *CcLPLs* decreased by degrees in liver, heart, fat, muscle, brain, intestine and spleen. In each tissue, the expression of *CcLPLA1s* was significantly higher than that of *CcLPLA2a*, and the expression of *CcLPLA2a* was significantly higher than that of *CcLPLBa*. The expression levels of *CcLPLA1s* and *CcLPLA2a* in liver, muscle and adipose tissues under normal feeding, starvation and refeeding conditions were determined by qPCR. The results showed that the expression levels of *CcLPLA1s* and *CcLPLA2a* in liver under starvation were significantly higher than those in the normal feeding group, while the expression levels in muscle and adipose tissue were opposite to those in liver. After refeeding, the expression levels of *CcLPLA1s* and *CcLPLA2a* were restored as normal feeding group in the three tissues. Using *E. coli* expression system, Skp-*CcLPLs* and SlyD-*CcLPLs* recombinant proteins were obtained. The enzymatic activity of each recombinant protein was determined by the p-nitrophenol method, and the results were (24.12 ± 0.96), (22.66 ± 0.46), (21.48 ± 0.47), (21.13 ± 0.46), (18.07 ± 0.39) and (16.49 ± 0.31) U/g for SlyD-*CcLPLA1a*, Skp-*CcLPLA1a*, Skp-*CcLPLBa*, Skp-*CcLPLA2a*, SlyD-*CcLPLBa* and SlyD-*CcLPLA2a*, respectively. Regardless of Skp or SlyD tags in the recombinant proteins, the enzymatic activities of *CcLPLs* from high to low were *CcLPLA1a*, *CcLPLBa* and *CcLPLA2a*. Determination of effect of pH and NaCl concentration on enzyme activity showed the optimal reaction condition of pH was 8.0 and the NaCl concentration that exerted the maximum activity was 0.6 mol/L. In conclusion, we explored the evolutionary expression of *CcLPLs* homologous genes, analyzed the temporal and spatial expression of *CcLPLA1s*, *CcLPLA2a* and *CcLPLBa*. The effects of starvation and refeeding on the expression of *CcLPLA1s* and *CcLPLA2a* were studied, and the results revealed the lipid metabolism and response countermeasures under starvation stress, and provided a target for controlling the fat content in *C. carpio*. The prokaryotic expressions of the recombinant proteins were successfully carried out and the enzymatic activities were determined, which provided a reference for the study of fish lipoprotein lipase.

Key words: *Cyprinus carpio*; lipoprotein lipase; gene expression; recombinant protein expression in prokaryotes; lipoprotein lipase activity

Corresponding author: TANG Yongkai. E-mail: tangyk@ffrc.cn.

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-45); National Key Research and Development Program (2022YFF0608203); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD37)