

草鱼与鲢鱼肥胖基因克隆与序列分析

郁颖, 梁旭方*, 李观贵, 王琳, 李光照

(暨南大学 生命科学技术学院, 广州 510632)

摘要: 肥胖基因产物 leptin 是调节哺乳动物摄食、能量代谢等生命活动的重要细胞因子。应用 RT-PCR 和 RACE 法获得了草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)和鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*) leptin 基因的全长 cDNA 序列分别为 1 096bp 和 1176bp, 编码 173 和 172 个氨基酸。氨基酸序列同源性分析表明, 草鱼和鲢鱼的 leptin 序列与其它鲤科鱼类 leptin 的同源性较高, 而与其他鱼类的 leptin 同源性很低, 但所有鱼类的 leptin 均含有用于形成二硫键的高度保守的半胱氨酸。系统进化树分析显示, 草鱼和鲢鱼 leptin 与其他鱼类 leptin 聚于一进化分支。应用 PCR 和 Genome Walker 方法, 进一步获得了草鱼和鲢鱼 leptin 基因的内含子和 5' 侧翼区序列。结果表明, 获得的草鱼和鲢鱼 leptin 基因长度分别为 2129bp 和 2192bp, 含有与其他脊椎动物 leptin 相似的基因结构(含三个外显子和两个内含子)。该研究为深入研究鱼类肥胖基因结构功能关系与鱼类抗肥胖品系定向遗传选育奠定了良好的基础。

关键词: 肥胖基因; 基因克隆; 序列分析; 草鱼; 鲢鱼

中图分类号: Q959.468; Q785; Q344 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2009)05-0480-07

Molecular Cloning and Analysis of Leptin Gene in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)

YU Ying, LIANG Xu-fang*, LI Guan-gui, WANG Lin, LI Guang-zhao

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Leptin, the product of the obese gene, is one of the key factors for the regulation of food intake and whole-body energy balance. Both grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) leptin full-length cDNA were cloned by RT-PCR and RACE methods. The sequences of leptin cDNA in grass carp and silver carp were 1096bp, 1176bp, and the deduced protein had 173, 172 amino acids respectively. The amino acid homologues analysis showed high identity in cyprinid fish. Despite lower amino acid identity between cyprinid fish and other leptins, conservation of both cysteine residues that formed leptin's single disulfide bridge inside the chain presented a certain similarity. Phylogenetic tree showed that leptin in grass carp and silver carp were in the same branch as other fishes. The 5'-flanking region and introns of leptin in grass carp and silver carp were characterized using Genome Walker and PCR methods. The genes were 2129bp and 2192bp in length respectively in grass carp and silver carp, with similar gene structures in other vertebrates (including 3 exons and 2 introns). This research will be helpful for further studies of fish leptin in cultivation and food safety.

Key words: Leptin; Gene cloning; Sequence analysis; Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*); Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)

在哺乳动物中, leptin 是调控摄食和能量平衡的重要因子, 它可以通过下丘脑调节摄食, 也可以通过提高脂肪代谢率消耗脂肪。自 Zhang et al (1994)

利用定位克隆技术克隆出小鼠肥胖基因, 鱼类肥胖基因研究成为该领域引人关注的焦点。然而由于鱼类 leptin 序列具有不同于哺乳动物的较大变异性, 通

收稿日期: 2009-03-31; 接受日期: 2009-08-20

基金项目: 国家科技部 973 项目(2009CB118702); 国家科技部 863 项目(2007AA09Z437); 国家自然科学基金项目(30670367); 广东省科技计划项目(2005B20301005); 广东省自然科学基金项目(031886)

*通讯作者(Corresponding author), 梁旭方, Tel: 020-85221497, E-mail: tliangxf@jnu.edu.cn

第一作者简介: 郁颖 (1986 —), 女, 硕士研究生, 主要从事分子遗传学研究, ingrid22@163.com

过基于不同物种基因序列同源性常规克隆有一定困难。直到2005年, Kurokawa et al (2005)才首次报道河豚(*Takifugu rubripes*) leptin基因序列, 该序列与人的氨基酸序列同源性仅13.2%。随后, 鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、绿色河豚鱼(*Tetraodon nigroviridis*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)等鱼类 leptin 序列研究陆续报道(Kurokawa et al, 2005; Huising et al, 2006; Murashita et al, 2008)。研究表明, 鱼类 leptin 序列间虽然普遍存在很大的序列差异, 但基因结构(如外显子数量分布)和蛋白质三级结构有较高的相似性。

鱼油因其含有多不饱和脂肪酸对维持细胞膜结构与正常生理功能有重要作用, 作为鱼类饲料广泛应用于养殖渔业。然而, 高不饱和化合物会引起脂质过氧化, 过多的多不饱和脂肪酸亦影响鱼类正常生长活动(Sargent et al, 1999)。草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是典型的草食性鱼类, 能量需求低于大多数肉食性鱼类, 对高脂肪饲料更敏感, 过量高不饱和脂肪酸摄入不仅引起草鱼食欲下降、生长延缓、脂肪蓄积(尤其在肝脏), 还影响脂蛋白合成以及造成脂质过氧化(Du et al, 2008)。鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)是滤食性鱼类, 更偏好人工饲料, 但鲢鱼脂肪积蓄问题至今尚无报道。草鱼和鲢鱼作为我国主要淡水养殖鱼类, 高脂肪饲料引起鱼类代谢障碍型脂肪肝、肉质与营养价值改变, 人食用过多不利于健康等问题亦在国际上日益受到重视。对其肥胖基因及其脂肪蓄积调控机理研究, 将对今后养殖鱼类抗肥胖品系定向遗传选育奠定基础, 具有巨大的经济价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 草鱼、鲢鱼均采自广州珠江水产研究所养殖池塘。

1.1.2 试剂 SV Total RNA Isolation System 为 Promega 公司产品; pMD 18-T Vector、Taq DNA 聚合酶为宝生物工程(大连)有限公司产品; SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit、BD GenomewalkerTM 购自 Clontech 公司; H. Q. & Q. Gel Extraction Kit II 购自 TIANGEN BIOTECH, Blood & Cell Culture DNA Kit 购自 QIAGEN 公司;

其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 草鱼和鲢鱼捕获后立即分离其肝脏, 总 RNA 的提取与纯化按 Promega 公司的 SV Total RNA Isolation System 试剂盒推荐方法进行。cDNA 第一链的合成使用 TOYOBO ReverTra Ace- α -TM 试剂盒, 分别以草鱼和鲢鱼肝脏总 RNA 为模板, oligo (dT)18 为反转录引物, 按试剂盒推荐方法进行操作。

1.2.2 草鱼与鲢鱼肝脏 leptin PCR 核心片段的扩增 根据斑马鱼、鲤鱼 leptin 氨基酸序列的保守区域设计一对简并引物 LEP01F 和 LEP02R(表 1), 分别以草鱼和鲢鱼肝脏 cDNA 为模板进行 PCR, 扩增条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 1 min, 40℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳后, 用 H.Q.&Q. Gel Extraction Kit II (U-gene) 回收纯化, 然后克隆至 pMD 18-T 载体(TaKaRa), 转化感受态 *E. coli* DH5 α , PCR 检测阳性克隆后送上海英骏生物技术有限公司用 ABI 3730 测序仪进行测序。

1.2.3 cDNA 5'末端和 3'末端的克隆 根据克隆得到的草鱼和鲢鱼肝脏 leptin cDNA 核心片段及试剂盒的要求分别设计 5'RACE 嵌套引物 CILEP 5'A1、CILEP5'A2 和 HMLEP5'A1、HMLEP5'A2(表 1)。RACE 采用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech, USA), 按其推荐方法进行。FIRST-PCR 反应条件均为: 94℃ 预变性 3 min; 然后 94℃ 30s, 57℃ 30s, 72℃ 1 min, 共 30 个循环; 最后 72℃ 再延伸 3 min。NEST-PCR 反应条件均为: 94℃ 预变性 3 min; 然后 94℃ 30s 63℃ 30s, 72℃ 1 min, 共 30 个循环; 最后 72℃ 再延伸 3min。RACE 产物纯化、克隆和测序。

1.2.4 内含子序列的扩增 草鱼与鲢鱼血液总 DNA 的提取均采用 QIAGEN 公司的 Blood & Cell Culture DNA Kit 试剂盒推荐方法进行。根据克隆得到的草鱼、鲢鱼 leptin 基因 cDNA 全序列与其它基因结构已知脊椎动物 leptin 基因相比较推测其内含子位置, 设计特异引物 CILEPI101F、CILEPI102R 和 CILEPI201F、CILEPI202R(表 1)分别用于扩增草鱼 lept

表 1 PCR 引物序列
Tab. 1 Sequences of PCR primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
LEP01F	5'-GTCAAAGTGCAGGCAGACACNAT(A/C/T)AT-3'
LEP02R	5'-ATTAAGTATCAGCTTTTGCATRAA(T/C)TG(T/C)TT-3'
CILEP' A1	5'-CTGGAAGGTAGTTAGGGT-3'
CILEP5' A2	5'-ATAGGTTTATCAGCAGGAA-3'
CILEP3' S1	5'-GGAGCCAGCCAATGGGAAGT-3'
CILEP3' S2	5'-ACGCCACCCACCACATTA-3'
CILEPGSP1	5'-AGAGAGAGAGCGA-3'
CILEPGSP2	5'-CTTTGAGATGTGAGGATTGTATGATA-3'
CILEPI101F	5'-TCATACAATCCTCACATCTCA-3'
CILEPI102R	5'-GTTCTTAATTCTGTGGATG-3'
CILEPI201F	5'-CATCCACAGAATTAAGGAAC-3'
CILEPI202R	5'-CAATAAGGATCTTTGGAGACAG-3'
HMLEP5' A1	5'-CAATAAGGATCTTTGGAGACAG-3'
HMLEP5' A2	5'-GTTCTTAATTCTGTGGATG-3'
HMLEP3' S1	5'-TTCATACAGAAGAAGCCACCC-3'
HMLEP3' S2	5'-ACATGGCTTTAGACAGAC-3'
HMLEPGSP1	5'-TGAGATGTGAGGATTGTATGA-3'
HMLEPGSP2	5'-TGAGATGTGAGGATTGTATGA-3'
HMLEPI101F	5'-TCATACAATCCTCACATCTCA-3'
HMLEPI102R	5'-GTTCTTAATTCTGTGGATG-3'
HMLEPI201F	5'-CATCCACAGAATTAAGGAAC-3'
HMLEPI202R	5'-CAATAAGGATCTTTGGAGACAG-3'

鱼和鲢鱼基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应条件与 5' RACE 二次 PCR 相同。

1.2.5 5' 侧翼调控区序列克隆 基因组步行法采用 BD Genomewalker™ Universal Kit (BD Biosciences clontech, USA), 实验操作按试剂盒推荐方法进行。设计基因特异引物 CILEPGSP1、CILEPGSP2 和 HMLEPGSP1、HMLEPGSP2(表 1), FIRST-PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 1 min, 57℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。将首次 PCR 产物稀释 50 倍, 取 1 μL 稀释液作为模板进行二次 PCR。NEST-PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。

1.2.6 生物信息学分析 通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的 BLASTN、BLASTX 进行核酸和蛋白序列相似性检索, 应用 DNASTar 分析软件包 MegAlign 软件进行同源性分析。使用软件 SignalIP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽序列预测。应用 GSDB(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>)绘制基因结构示意图并手工修改。应用 TFBIND (<http://tfbind.ims.u-tokyo.ac.jp/>)推测翻译调控区域。将草鱼和鲢鱼 leptin 氨基酸序列与 GenBank

上公布的其他动物 leptin 序列一起, 用 Phylip 3.68 软件采用邻接法(NJ), 以小鼠为外类群, 构建系统进化树, 1 000 次重复计算自展分析值。

2 结 果

2.1 全长 cDNA 序列的获得

分别以草鱼和鲢鱼肝脏 cDNA 为模板, 简并引物进行 PCR 扩增, 得到大小均约为 400 bp 的 PCR 产物。将测序得到的序列在 NCBI 网站上 BLAST 确认。5' RACE 和 3' RACE 技术从草鱼和鲢鱼肝脏分别获得 2 个预期片段大小的 PCR 产物。通过序列拼接, 确定草鱼和鲢鱼 leptin 全长 cDNA。序列分析表明, 草鱼 leptin cDNA(Genbank ID EU719623)全长 1096 bp, 其中 5' -端非翻译区(5' -UTR)长 70 bp, 3' -端非翻译区(3' -UTR)长 504 bp。开放阅读框(ORF)长 522 bp, 编码 173 个氨基酸, polyA 加尾信号为 ATAAA。鲢鱼 leptin cDNA (Genbank ID EU719624)全长为 1176 bp, 其中 5' 非翻译区为 105 bp, 3' 非翻译区为 552 bp, 开放阅读框为 519 bp, 编码 172 个氨基酸, polyA 加尾信号为 ATAAA。使用软件 SignalIP 3.0 推测草鱼与鲢鱼 leptin N 端第 20~21 位酶切位点, 各能形成一段信号肽和成熟蛋白。

2.2 草鱼、鲢鱼 leptin 基因内含子序列扩增与分

析

由其他基因结构已知脊椎动物 *leptin* 基因相比较推测草鱼、鲢鱼 *leptin* 基因含有 2 个内含子，在推测的内含子位置两端分别设计特异引物扩增两个内含子，分别以草鱼和鲢鱼基因组 DNA 为模板进行序列扩增、测序，经过序列拼接得到草鱼、鲢鱼 *leptin* 基因序列。草鱼 *leptin* 基因全长 2129bp，编码区位于外显子 2 和外显子 3 内，被一个长为 111 bp 的内含子所隔离，外显子 1 为 26 bp 的非编码序列，位于外显子 2 上游 948bp 处，外显子 2 为 197bp，外显子 3 为 847bp。鲢鱼 *leptin* 基因全长 2192bp，编码区位于外显子 2 和外显子 3 内，被一个长为 111 bp 的内含子所隔离，外显子 1 为 26 bp 的非编码序列，位于外显子 2 上游 951bp 处，外显子 2 为 197bp，外显子 3 为 907bp。比较草鱼、鲢鱼与人、鼠 *leptin* 基因结构发现，外显子与内含子的数目与哺乳动物一致，但内含子 1、2 与外显子 3 中的非翻译区长度有较大差别(图 1)。

2.3 基因组步行法克隆草鱼、鲢鱼 *leptin* 基因 5' 侧翼序列

应用Genome Walker技术，分别以草鱼和鲢鱼基因组DNA为模板进行序列扩增、测序，经过序列拼接得到草鱼、鲢鱼*leptin*基因5' 侧翼区长度为265 bp的序列。应用TFBIND推测5' 侧翼区上基因启动

区相关的结构，预测草鱼和鲢鱼*leptin*基因侧翼序列中含有TATA盒， C/EBP结合顺序、GC盒和多个可调节其表达的调控元件，如OCT1、SP1、PAX5、AP1等(图2、图3)。

2.4 *Leptin* 序列同源性分析

应用 DNASTar 分析软件包 MegAlign 软件，比较草鱼、鲢鱼、斑马鱼、鲤鱼、青鳉、河豚的 *leptin* 氨基酸同源性。结果显示，草鱼与斑马鱼、鲤鱼亚型 1、鲤鱼亚型 2、青鳉和河豚的序列同源性分别为 73.1%、76.0%、57.1%、18.9%和 18.9%；鲢鱼与上述这些鱼类的序列同源性分别为 72.0%、70.3%、56.0%、18.9%、18.9%，草鱼与鲢鱼间的序列同源性为 88.6%。鲤形目草鱼、鲢鱼、斑马鱼、鲤鱼之间的同源性较高，而与鳉形目（青鳉）和鲇形目（河豚）同源性较低，但形成链内二硫键的两个半胱氨酸残基相当保守(图 4)。

2.5 *Leptin* 系统进化分析

用 Phylip 3.68 软件将草鱼、鲢鱼 *leptin* 氨基酸序列与 GenBank 上公布的其他脊椎动物 *leptin* 氨基酸序列一起构建了系统进化树(图 5)，从图中可以看出，鲤科鱼类草鱼、鲢鱼与其他鲤科鱼类，如鲤鱼、斑马鱼、金鱼(*Carassius auratus*)聚于一支，亲缘关系最近。这与基于形态学的鱼类系统发育研究结论基本一致。

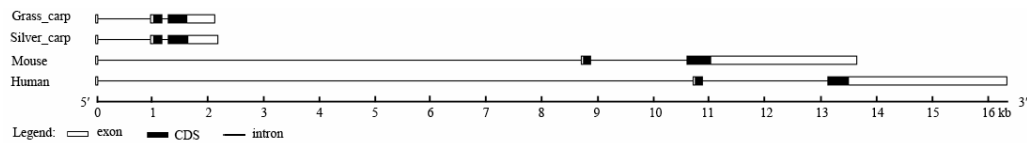


图 1 *Leptin* 基因结构示意图比较
Fig. 1 Comparison of *leptin* gene structure



```

-265                               c g a c g g c c c g g g c t g g t a a a g c t a -241
                                      CEBPB
-240   c a a a t c t a t a a t g a a t t g t a a c a c a a c g a t c a c a t g g t g a c g g t g g c g g a a g t a t t a c a -181
                                      GC
-180   a t g a c a a a t a t t t g t a g t a c g t c t g t g t g a g a t g g g t t t g t g t t c c g c t c g a g g t t t g -121
                                      SP1                                PAX5
-120   t g t t g t g t c c c c c t c a t g c t g t t c t g c a c t g g g a g a a t c a g a g a a g g a a t g g c t g a g g t -61
                                      SPI                                CAAT
-60     g a t t c a c a c a t g a g t c a a c a g c t a t c a g c t a t a t a a g c c t g a c c a c t c a t g g a g c c t g g g -1
          A P 1                                T A T A
+1     T A T C A T A C A A T C C T C A C T C A A A G C A G G T A T T G C A C T A T T G C C A A G A T A A A G A C C A C C +60
+61    A T A T A C A G G A A C C A T G +76

```

图 3 鲢鱼 leptin 基因 5' 侧翼区调控元件预测

Fig. 3 Sequence of the putative regulatory elements in 5'-flanking region of leptin gene in silver carp

grass carp	--MYSPVLLYTCFLSILGMIDGRSIPIHQDNLKNLVKLQADTIIHRIKEHNEKLKLSPKI	60
silver carp	--MYFPVLLYTCFLSILGLIDGRSIPFHPESLKS--KQQADTIIHRIKEHNEKLKLSPKI	60
common carpI	--MYFSALLYPCILAMLSLVHG--IPIHSDSLKNLVKLQADTIIIRIKDHNAELKLYPKL	60
common carpII	--MYFSVLLYPCILGMLSLVHA--IPVHPDSLKNLVKLQADTIIILRIKDHNEKLKLSPKL	60
zebrafish	--MRFPALRSTCILSMLSLIHC--IPVHQHDRKNV KLQAKTIIIVRIEHIDGQNLPLTL	60
medaka	--MDSALVLF AFLFHCLNVATAAPVNPQLQEMKSNVIDIAKEPSLRLENI IQT-----	60
pufferfish	MDHILALVLALLPLSLCVALPGALDAMDVEKMSKVTWKAQGLVARIDKHFPD-----	60
	* * *	
grass carp	LIGDSELYPEVPADKPIQGLGSIVDTLTTTFQKILQTLPGHVSQHLNDMSTLLEYFKDRM	120
silver carp	LIGDSELYPEVPADKPIQGLGSI IDTLTTTFQKVLQTLPGHVSQHLSDVSTLLDYFKVWM	120
common carpI	LIGDPELYPEVPADKPIQGLGSIMDTITTFQKVLQRLPKGRVSQIHIDLSTLLGHLKERM	120
common carpII	LIGDPELYPEVPANKPIQGLGSIVETLSTFHKVLQRLPKGHVSQIRNDLFTLLGYLKDRM	120
zebrafish	IIGDPGHYPEIPADKPIQGLGSIMETINTFHKVL	

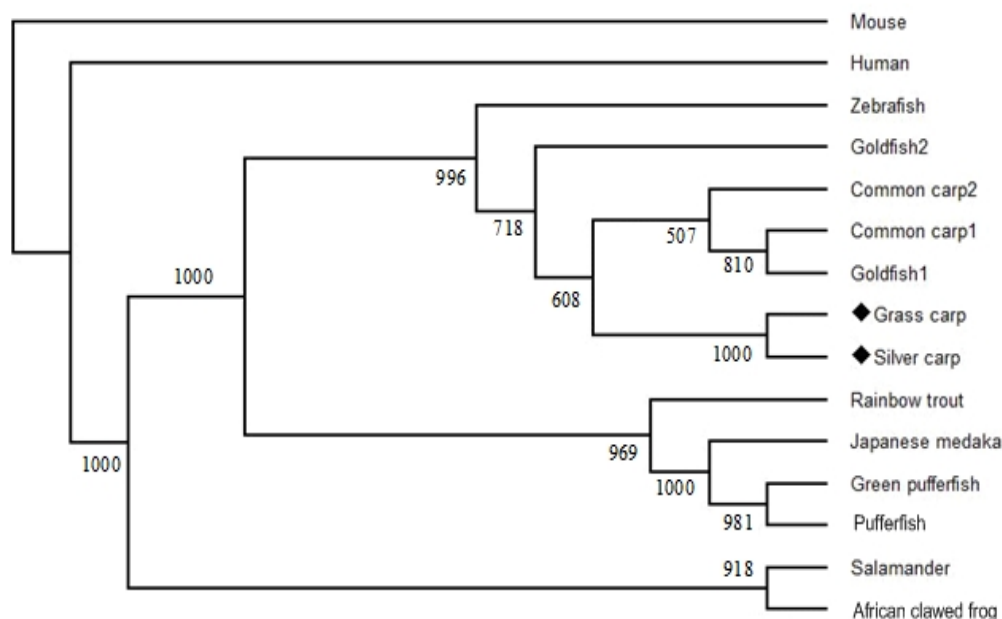


图 5 Leptin 系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of leptin

用 Phylip 3.68 软件 NJ bootstrap 方法构建, 分支上的数字代表 bootstrap 值, ◆: 本实验克隆得到的 leptin。

The tree is constructed by the neighbor-joining bootstrap using the Phylip 3.68 software. The phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining bootstrap. The numbers on the branches indicate the number of times the partition of the species into the two sets which are separated by that branch occurred among the trees, out of 1000.00 trees. Use mouse as outgroup species. Leptin obtained in our lab through cloning method is signed by '◆'. The GenBank accession numbers of the sequence used in the figure are as follows: Human (P41159); Mouse (P41160); African clawed frog (AAX77665); Goldfish1 (ACL68083); Goldfish2 (ABV57772); Rainbow trout (BAG09232); Green Pufferfish (BAD94451); Salamander (22154139).

3 讨论

本研究克隆得到草鱼和鲢鱼全长 cDNA 序列, 分析表明草鱼和鲢鱼 leptin N 端第 20~21 位为酶切位点, 形成信号肽和成熟蛋白, 这与哺乳动物(如人、小鼠等)基本一致(Zhang et al, 1994)。比较草鱼、鲢鱼和哺乳动物 leptin 基因结构发现, 外显子与内含子的数目与哺乳动物一致, 但内含子 1、2 与外显子 3 中的非翻译区长度有较大差别。这些非翻译区对 leptin 基因的表达调控是否相关有待进一步研究。比较鲤鱼、鲢鱼与其他鱼类 leptin 氨基酸同源性, 显示鱼类间的 lepin 同源性不高, 但形成链内二硫键的两个半胱氨酸残基相当保守, 可能与 leptin 的结构功能维持有重要作用。Boute et al(2004)通过突变实验证实, 这两个半胱氨酸形成的链内二硫键对 leptin 分泌是十分必要的。从绘制的系统进化树看, 草鱼和鲢鱼 leptin 与其他鱼类处于同一进化分枝, 其中与鲤科鱼类亲缘关系最近, 这与基于形态学的鱼类系统发育研究结论基本一致。分子进化认为硬骨鱼和四足动物在 450 万年前由同一祖先进化

而来(Kumar & Hedges, 1998), 鲤科鱼类在 300 万年前从硬骨鱼祖先中分离出来(Taylor et al, 2003) 的观点, 也支持这一结果。

对草鱼和鲢鱼 leptin 基因距启动子上游、长 265 bp 的 5'侧翼区克隆和分析发现可能的调控元件: TATA盒、C/EBP结合顺序、SP1、GC盒、OCT1、PAX5、AP1等。突变实验(Mason et al, 1998)发现 TATA盒、C/EBP结合顺序、SP1和LP1对小鼠 leptin 表达均有重要作用, 各个调控元件的点突变都会造成启动活性下调 50%~67%, 若干调控元件同时突变还存在叠加效应, C/EBP和TATA基序同时突变可引起启动活性下调约 90%, 提示在 leptin 基因序列存在着多个调控位点。预测的 5'侧翼区的调控元件对草鱼和鲢鱼 leptin 转录调节的意义还有待进一步研究。

哺乳动物 leptin 对鱼类摄食作用影响研究结果显示, 哺乳动物 leptin 对银鲑(*Oncorhynchus kisutch*)、鲶鱼(*Ictalurus punctatus*)和绿色太阳鱼(*Lepomis cyanellus*)摄食与体重均无影响(Baker et al, 2000; Silverstein & Plisetskaya, 2000; Londraville & Duball,

2002); 而金鱼中则发现具有抑制摄食、控制体重的功能(Volkoff et al, 2003; de Pedro et al, 2006)。提示鱼类与哺乳动物leptin同源性较低, leptin的功能存在物种特异性。因此, 鱼类leptin基因克隆对其功能研究非常重要。Murashita et al(2008)在虹鳟中重组leptin表达诱导实验初步显示, 虹鳟leptin在虹鳟体内具有抑制摄食的作用。本研究对草鱼与鲢鱼leptin

的克隆为鱼类leptin在调节摄食和能量平衡方面的功能有待进一步研究证实。在哺乳动物的研究中表明, leptin除在调控摄食和能量代谢上的功能外, 还具有激素分泌、生长、生殖和免疫等功能(Tang BL, 2008; Fantuzzi & Faggioni, 2000; Holness et al, 1999)。而鱼类leptin是否具有这些功能仍需进一步研究。

参考文献:

- Baker DM, Larsen DA, Swanson P, Dickhoff WW. 2000. Long-term peripheral treatment of immature coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with human leptin has no clear physiologic effect[J]. *Gen Comp Endocrinol*, **118**: 134-138.
- Boute N, Ziberfarb V, Camion L, Bonnafous S, Marchand-Brustel L, Issad T. 2004. The formation of an intrachain disulfide bond in the leptin protein is necessary for efficient leptin secretion[J]. *Biochimie*, **86**: 351-356.
- de Pedro N, Martinez-Alvarez R, Delgado MJ. 2006. Acute and chronic leptin reduces food intake and bodyweight in goldfish (*Carassius auratus*)[J]. *J Endocrinol*, **188**: 513-520.
- Du ZY, Clouet P, Huang LM, Degrace P, Zheng WH, He JG, Tian LX, Liu YJ. 2008. Utilization of different dietary lipid sources at high level in herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): mechanism related to hepatic fatty acid oxidation[J]. *Aquacul Nutr*, **14**: 77-92.
- Fantuzzi G, Faggioni R. 2000. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis[J]. *J Leukoc Biol*, **68**(10): 437-446.
- Holness MJ, Munns MJ, Sugden MC. 1999. Current concepts concerning the role of leptin in reproductive function[J]. *Mol Cell Endocrinol*, **157**: 198-202.
- Huising MO, Geven EJ, Kruiswijk CP, Nabuurs SB, Stolte EH, Spanings FA, Verburg-van Kemenade BM, Flik G. 2006. Increased leptin expression in common Carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation[J]. *Endocrinology*, **147**: 5786-5797.
- Kurokawa T, Uji S, Suzuki T. 2005. Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*[J]. *Peptides*, **26**: 745-750.
- Kumar S, Hedges SB. 1998. A molecular timescale for vertebrate evolution[J]. *Nature*, **392**: 917-920.
- Londraville RL, Duvall CS. 2002. Murine leptin injections increase intracellular fatty acid-binding protein in green sunfish (*Lepomis cyanellus*)[J]. *Gen Comp Endocrinol*, **129**(1): 56-62.
- Mason MM, He Y, Chen H, Quon MJ, Reitman M. 1998. Regulation of leptin promoter function by SP1, C/EBP, and a novel factor[J]. *Endocrinology*, **139**: 1013-1022.
- Murashita K, Uji S, Yamamoto T, Rønnestad I, Kurokawa T. 2008. Production of recombinant leptin and its effects on food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **150**(4): 377-84.
- Sargent JR, Bell JG, McEvoy L, Tocher DR, Estevez A. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish[J]. *Aquaculture*, **177**: 191-199.
- Silverstein JT, Plisetskaya EM. 2000. The effects of NPY and insulin on food intake regulation in fish[J]. *Am Zool*, **40**: 296-308.
- Tang BL. 2008. Leptin as a neuroprotective agent[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **368**(2): 181-185.
- Taylor JS, Braasch I, Frickey T, Meyer A, Van de Peer Y. 2003. Genome duplication, a trait shared by 22,000 species of ray-finned fish. *Genome Res*