Zoological Research

中华鲟及六种淡水养殖鱼类脂蛋白脂酶和 肝脂酶基因克隆及系统进化分析

黄 燕,梁旭方*,王 琳,李光照,刘秀霞,姚 煜

(暨南大学 生命科学技术学院, 广州 510632)

摘要:为了研究鱼类脂蛋白脂酶(liportein lipase, LPL)、肝脂酶(hepatic lipase, HL)基因结构、功能及分子系统 关系,作者克隆了中华鲟(Acipenser sinensis)、鲢(Hypophthalmichthys molitrix)、鳙(Aristichthys nobilis)、草鱼 (Ctenopharyngodon idellus)、鲮鱼(Cirrhinus molitorella)、尼罗罗非鱼(Oreochromis niloticus)和斑鳢(Channa maculata) 的 LPL 和 HL 基因 cDNA 核心序列,并推测了其相应氨基酸序列。同时,还应用 5'RACE 和 3'RACE 技术分别扩 增中华鲟、鲢肝脏 LPL 基因与中华鲟肝脏 HL 基因 cDNA 全序列。序列同源性分析表明,LPL 和 HL 氨基酸序列 分别在哺乳类动物、鸟类、鱼类中相对保守。与已知的脊椎动物内皮脂酶(endothelial lipase, EL)和胰脂酶(pancreatic lipase, PL)氨基酸序列构建系统进化树,发现 LPL、HL、EL 与 PL 同属脂肪酶家族,四者聚集成一有根树。

关键词: 脂蛋白脂酶; 肝脂酶; 基因克隆; 序列分析; 系统进化; 淡水鱼类 中图分类号: Q959.463; Q78; Q951.3 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2010)03-0239-11

Molecular Characterization and Evolutional Analysis of Liportein Lipase and Hepatic Lipase Gene in *Chinese Sturgeon* and Other Six Freshwater Fishes

HUANG Yan, LIANG Xu-Fang^{*}, WANG Lin, LI Guang-Zhao, Liu Xiu-Xia, YAO Yu

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

Abstract: In order to study the structural, functional and molecular evolutional relationship of fish liportein lipase (LPL) and hepatic lipase (HL) genes, seven liver LPL and HL cDNA partial sequences were isolated from *Acipenser* sinensis, Hypophthalmichthys molitrix, Aristichthys nobilis, Ctenopharyngodon idellus, Cirrhinus molitorella, Oreochromis niloticus, Channa maculate by RT-PCR. Three full-length cDNA sequences of LPL, HL of Acipenser sinensis and LPL of Hypophthalmichthys molitrix were obtained by RACEs. From the sequence analysis and homologous results, the amino acid sequences of LPL and HL are relatively conserved in mammals, birds and fishes. Taken together with these obtained amino acid sequences and sequences of all known LPL, HL, EL and PL from other vertebrates, a phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining method. The result supports that all of them belong to lipase family.

Key words: LPL; HL; Gene cloning; Sequence analysis; Molecular evolution; Fresh water fishes

脂类的贮存和代谢对动物体维持正常的生命 活动具有重大意义。与陆生动物相比,鱼类对碳水 化合物的利用能力较差,如本文中的硬骨鱼类,其 中特别是肉食性鱼类,如斑鳢,主要以蛋白质和脂 肪作为能量来源(Yang, 2003)。脂酶是一种水溶性的 酶,对食物中脂肪的吸收、平衡能量和血浆脂蛋白 的代谢起着重要的作用,其成员包括脂蛋白脂酶 (lipoprotein lipase, LPL)、肝脂酶(hepatic lipase, HL)、

收稿日期: 2009-07-02; 接受日期: 2010-04-16

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:黄燕(1981-),女,硕士研究生,主要从事分子遗传学研究; E-mail: cafei_cafei@163.com

内皮脂酶(endothelial lipase, EL)和胰脂酶(pancreatic lipase, PL)等(Wong & Schotz, 2002; Mukherjee, 2003)。其中, LPL 是脂蛋白代谢的关键酶之一, 与 机体的脂质代谢及肥胖与否密切相关,不同组织器 官 LPL 表达水平的高低, 直接决定这些组织器官脂 质底物配额的多少;间接决定从食物中摄入脂类的 代谢途径(以体脂形式贮备起来,或作为能源底物消 耗掉),从而最终对机体脂质蓄积状况产生决定性影 响(Auwerx et al, 1992; Zechner, 1997; Yamada et al, 2000)。早期对海水鱼虹鳟(Oncorhynchus mykiss)、 海水鱼真鲷(Pagrus major)等研究显示与哺乳动物 不同,鱼类成体肝脏脂质普遍含量高,并存在 LPL 活性(Lindberg & Olivecrona, 1995; Liang et al, 2002b)。HL 和 LPL 基因同属一组基因簇,在进化 上较为保守;在功能上有相似之处,却是两种不同 性质的酶(Wong & Schotz, 2002)。目前, HL 在鱼类 脂代谢中作用的相关研究还很少。对此,我们选择 了硬骨鱼类中较为具有代表性的中华鲟(Acipenser sinensis) (鲟形目)、鲢(Hypophthalmichthys molitrix)、鳙(Aristichthys nobilis)、草鱼(Ctenopharyngodon idellus)、鲮鱼(Cirrhinus molitorella) (鲤 形目)、尼罗罗非鱼(Oreochromis niloticus)和斑鳢 (Channa maculata) (鲈形目)作为研究,通过克隆不 同鱼类 LPL 和 HL 基因 cDNA 序列,并推测得到其 相应氨基酸序列,研究其生物大分子的特征,从基 因进化的角度研究基因序列与功能的关系(Tautz et al, 2003),为进一步研究鱼类脂代谢机制的形成与 演讲, 促进鱼类健康生长, 预防鱼类脂代谢疾病等 提供新信息。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验用中华鲟 (Acipenser sinensis, Chinese sturgeon)1 尾取自宜昌葛洲坝工程总局中华鲟人工 繁殖研究所。鲢(Hypophthalmichthys molitrix, silver carp)、鳙(Aristichthys nobilis, bighead carp)、草鱼 (Ctenopharyngodon idellus, grass carp)、鲮鱼 (Cirrhinus molitorella, mud carp)、尼罗罗非鱼 (Oreochromis niloticus, Nile tilapia)和斑醴(Channa maculate, Taiwan snakehead)各1尾取自中国水产科 学研究院珠江水产研究所。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

从中华鲟、鲢、鳙、草鱼、鲮鱼、尼罗罗非鱼和斑醴快速分离肝脏组织,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RNA LA PCRTM Kit (AMV) Ver.1.1(TaKaRa)试剂盒,分别以 中华鲟、鲢、鳙、草鱼、鲮鱼、尼罗罗非鱼和斑醴 肝脏总RNA为模板,oligo (dT)₂₀为反转录引物,操 作按试剂盒推荐方法进行。-20℃保存备用。

1.3 中华鲟、鲢、鳙、草鱼、鲮鱼、尼罗罗非鱼和 斑鳢 LPL 和 HL 基因 cDNA 部分序列的克隆

根据已知脊椎动物 LPL 氨基酸保守序列,设计 合成 4 个简并引物(表 1)。引物 LPL01F 和 LPL02R 用于扩增尼罗罗非鱼、草鱼和鳙 LPL cDNA 核心序 列。引物 LPL01F 和 LPL03R 用于扩增中华鲟、鲢、 斑鳢 LPL cDNA 核心序列。LPL01F 和 LPL04R 用 于扩增鲮鱼 LPL cDNA 核心序列。根据克隆片段设 计特异引物 LPL05F 和 LPL03R 扩增尼罗罗非鱼、 草鱼和鳙 LPL cDNA 重叠片段。

根据已知脊椎动物 HL 氨基酸序列的保守区域 设计 3 个简并引物克隆多种鱼类 HL cDNA 核心序 列:引物 HL01F 和 HL03R 用于扩增中华鲟、草鱼、 尼罗罗非鱼和斑鳢 HL cDNA 核心序列;引物 HL02F 和 HL03R 用于扩增鲢、鳙、鲮鱼 HL cDNA 核心序 列。根据克隆所获片段设计特异引物 HL01F 与 HL04R 扩增鳙 HL cDNA 重叠片段。以上述 cDNA 为模板,用 Taq DNA 聚合酶(TaKaRa)进行 PCR 扩 增,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。

1.4 中华鲟 LPL、HL 和鲢 LPL 基因 5'端 cDNA 扩增

根据克隆得到的中华鲟LPL、HL和鲢LPL基因 的cDNA核心片段和SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clotech)设计 3 对下游嵌套引物: ASLPL5'R01 和ASLPL5'R02、ASHL5'R01 和 ASHL5'R02、HMLPL5'R01 和HMLPL5'R02(表 1)。 上游引物由试剂盒提供。5'RACE cDNA合成用试剂 盒提供的 5'- CDS Primer A与SMART II A oligo引 物,取总RNA 2.7 μL,操作参照试剂盒进行。首次 PCR反应体系为 10×BD Advantage 2 PCR Buffer 5 μL、dNTP (10mmol/L) 1μL、10×UPM 5 μL,分别 加ASLPL5'R01、ASHL5'R01 和HMLPL5'R01 各 1

表 1 中华鲟、鲢、鳙、草鱼、鲮鱼、尼罗罗非鱼和斑鳢 LPL 和 HL 基因克隆 PCR 引物序列 Tab. 1 PCR primer sequences for cloning lipoprotein lipase and hepatic lipase gene from Chinese sturgeon, silver carp, bighead carp, grass carp, mud carp, Nile tilapia and Taiwan snakehead

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')					
LPL01F	CCAAGACCTTCATAGTGAT(T/C)CA(T/C)GG(C/A)TGG					
LPL02R	CCCTCAGCCATGTCATTGT(T/G)GT(A/G)GA(T/C)GG					
LPL03R	CTGAAGAAATGCACCTTCAC(C/T)TG(G/A)TA(G/A)TG					
LPL04R	GCCTGGCTGGAAGGTGCCTCC(G/A)TT(C/G)GG(G/A)TA					
LPL05F	ACGTCCTGCACACCAACA					
HL01F	CTTCCTCTGGCTATCATCAT(C/T)CA(T/C)GG(G/C)TGG					
HL02F	GATGCCAAGTTTGTGGATGC(T/C)AT(T/C/A)CA(T/C)AC					
HL03R	GGTCTTAACTGTGTTCCACAT(A/G)TT(G/A/C/T)GCCCA					
HL04R	AGGCTGTTTGATGCCCAC					
5'RACE						
ASLPL5'R01	AGCCAGTCCACCACGATCACGTT					
ASLPL5'R02	TCCAACTCTCAAACAGCC					
ASHL5'R01	CGATGACCACGTTGCTGTACCTCA					
ASHL5'R02	TCACCCAGCTCTCCAGCAT					
HMLPL5'R01	TGACGTTGGGTAATGTTGTTGCG					
HMLPL5'R02	TGTTGGCTCTCGTTCATA					
3'RACE						
ASLPL3'01F	CGTCAACAAAGTGAGAAACAAG					
ASLPL3'02F	ATGTATCTGAAGACCAGG					
ASHL3'01F	TGCCAATCACTCTAGTTGAGG					
ASHL3'02F	TCGGCGACCTGATGGTTCT					
HMLPL3'01F	CACACGCAGGAGCTGCAGAATG					
HMLPL3'02F	CCAGAAACATGATGCCATA					

µL、cDNA 4 µL、50×BD Advantage 2 Polymerase MIX 1 µL,加 PCR-Grade water 至 50 µL。PCR 反 应条件为: 94 ℃预变性 3 min; 94 ℃ 30 s, 65 ℃ 30 s, 72 ℃ 3 min, 共 25 个循环;最后 72 ℃延伸 7 min。 取首次扩增产物 2 µL,用 ASLPL5'R02、ASHL5'R02 和 HMLPL5'R02,及 NUP 各 1 µL 进行二次 PCR 扩 增,扩增条件为: 94 ℃预变性 3 min, 94 ℃ 45s, 60 ℃ 45s, 72 ℃ 45 s, 共 30 个循环;最后 72 ℃延 伸 5 min。

1.5 中华鲟 LPL、HL 和鲢 LPL 基因 3' 端 cDNA 扩增

3'RACE 的操作参照 3'-Full RACE Core Set 试 剂盒(TaKaRa)推荐方法进行。首先以试剂盒提供的 oligo dT-3sites Adaptor primer 为引物进行逆转录反 应, 然后分别以试剂盒提供的 3 sites Adaptor primer

和 3'RACE PCR 引物 ASLPL3'01F、ASHL3'01F 和 HMLPL3'01F 进行首次 PCR 反应,反应条件为: 94 ℃预变性 3 min, 94 ℃ 45 s, 57 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s,共 30 个循环;最后 72 ℃延伸 5 min。巢式 PCR 所用引物 3sites Adaptor primer 和 ASLPL3'02F、 ASHL3'02F 和 HMLPL3'02F (表 1), PCR 反应条件 与 5'RACE 二次 PCR 相同。

1.6 PCR 产物的克隆及序列分析

PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳纯化, H.Q.&.Q. Gel Extraction Kit II (U-gene)回收后克隆 至 pMD 18-T 载体(TaKaRa),转化感受态 *E.coli* JM109,利用 M13 正反向引物,通过 PCR 反应检 测得到阳性克隆,阳性克隆由上海生物工程技术有 限服务公司进行测序。序列同源性分析使用 Vector NTI suite 6.0 软件,利用 Mega 3.1 构建系统发生树。

2 结 果

2.1 中华鲟、鲢 LPL 基因 cDNA 全序列及鳙、草 鱼、鲮鱼、尼罗罗非鱼和斑鳢 LPL 基因 cDNA 部分序列

测序后获得中华鲟、鲢、鳙、草鱼、鲮鱼、尼 罗罗非鱼和斑鳢 LPL cDNA 核心序列,长度分别为 842 bp、834 bp、833 bp、833 bp、510 bp、842 bp 和 842 bp,分别编码 280、278、277、277、169、 280 和 280 个氨基酸,将测序得到的序列在 NCBI 网 站 上 BLAST 确 认。GenBank ID 分 别 为 EU715407、FJ436065、FJ436071、FJ436077、 FJ436069、FJ436066 和 FJ436067。

5'RACE 和 3'RACE 技术分别从中华鲟肝脏获得 2 个预期片段大小的 PCR 产物,对这 2 个片段进行克隆、测序,分别得到 437 bp 和 612 bp 的 cDNA 片段。通过序列拼接,确定中华鲟 LPL 基因 cDNA 全长 1722 bp。序列分析表明,起始密码子为 ATG,

终止密码子为 TGA, polyA 加尾信号为 AATAAA。 开放阅读框(ORF)长1506 bp,5'-端非翻译区(5'-UTR) 长 136 bp, 3'-端非翻译区(3'-UTR)长 80 bp,编码 501 个氨基酸,推测的蛋白质相对分子质量为 57.2 k,等电点为 7.77 (图 1)。

5'RACE 和 3'RACE 技术分别从鲢肝脏获得 2 个预期片段大小的 PCR 产物,对这 2 个片段进行克 隆、测序,分别得到 554 bp 和 1119 bp 的 cDNA 片 段。通过序列拼接,确定鲢 LPL 基因 cDNA 全长 2 319 bp。序列分析表明,起始密码子为 ATG,终止 密码子为 TAA,polyA 加尾信号为 AATATA。开放 阅读框(ORF)长 1524 bp,5'-端非翻译区(5'-UTR)长 161 bp,3'-端非翻译区(3'-UTR)长 634 bp,编码 507 个氨基酸,推测的蛋白质相对分子质量为 57.7 k, 等电点为 8.06(图 2)。在推测氨基酸序列中发现催化 位点、脂质结合位点,保守的半胱氨酸残基位点和 糖基化位点等(图 3)。

1	GAGAATATAGAAAGTGGAAAGGAGGGACTCTGTGCTTAAAGGATAC	46
47	AGCGCAGGCTCAGCAGCAGCATTACTGTAACAGTTAGGTTGGAATACTGCAAAAACCAATAGTCTATTTTTTCTGGATTTTTCTAACGAAT	136
137	ATG GGAAGAGAAAAAAATGCTTTATTGGCGATTGTATGGATATACTTGTTAAAAACGTGCGCAAGTTTTTCAAATACTACAACTGAAGCA	226
1	M G R E K N A L L A I V W I Y L L K T C A S F S N T T T E A	30
227	ACCCTTTTAACAAACAGCACGGAGTGGGTTGTCGACTACAGCAGCATCGAATCCAAGTTCTCTCTGCGCACGCCTGAACTTCCTGACGAT	316
31	T L L T N S T E W V V D Y S S I E S K F S L R T P E L P D D	60
317	GACACCTGTTACCTGGTCCCGGGGCAACCTGAGACCATCGCGCAATGCAAATTCAACCAGACCATAAAGACCTTCGTGGTCATCCACGGG	406
61	D T C Y L V P G Q P E T I A Q C K F N Q T I K T F V V I H G	90
407	TGGACGGTGACTGGGCTGTTTGAGAGTTGGATCCCCAAGCTGGTGTCAGCGCTGTACGAGAGAGA	496
91	W T V T G L F E S W I P K L V S A L Y E R E P H S N V I V V	120
497	GACTGGCTGCACCGAGCGCAGCAGCACTACCCCACCTCCGCTGCGTACACTGAGCTAGTGGGGGCAAGATGTGGCCAAGTTCGTGGACTGG	586
121	D W L H R A Q Q H Y P T S A A Y T E L V G Q D V A K F V D W	150
587	ATGGAGAGTCAAATAAACTACCCTTTGGAGATGTTTCATCTGCTCGGGTATAGTCTCGGAGCTCACGTTGCTGGCATTGTCGGCAGTCTC	676
151	MESQINYPLEMFHLLGYSLGAHVAGIVGSL	180
677	ACAAACAACAAGGTCAACCGAATCACAGGCCTCGATCCGGCCGG	766
181	T N N K V N R I T G L D P A G P T F E Y A E E Q R R L S P D	210
767	GATGCTAACTTTGTGGATGTGCTGCACACCTACACCAGGGGCTCCCCCGACCGGAGCATTGGTATCCAGAAGCCAGTGGGCCACGTTGAT	856
211	D A N F V D V L H T Y T R G S P D R S I G I Q K P V G H V D	240
857	ATCTACCCCAATGGGGGGGGTCTTCCAGCCAGGCTGTGATCTGCACAAAGCCATGCTCATGATTGCTGCCAATGGATTTGCAGATATGGAC	946
241	IYPNGGVFQPGCDLHKAMLMIAANGFADMD	270
947	CAGATCGTGAAATGCTCCCATGAACGCTCCATCCACCTGTTCATCGATTCGCTGTTGAACGAGGAGAAGCCGAGCATGGCATACCGCTGC	1036
271	Q I V K C S H E R S I H L F I D S L L N E E K P S M A Y R C	300
1037	AACACCAAGGAAGCCTTCGACAAGGGGCTCTGCCTGAGCTGCCGCAAGAACCGCTGCAACAACCCCTGGGCTATGACGTCAACAAAGTGAGA	1126
301	N T K E A F D K G L C L S C R K N R C N T L G Y D V N K V R	330
1127	AACAAGAGGAGCGCCAGGATGTATCTGAAGACCAGGGAGGTGATGCCTTACAAAGTTTTCCACTTTCAGATCAAGGTGCATTTCTTCAAT	1216
331	N K R S A R M Y L K T R E V M P Y K V F H F Q I K V H F F N	360
1217	AGGATAAACATCTCCTTCACAGATCAGCCAATCCTGTTGTCTCTGTACGGGACACATAATGAAGTCCAGGACATTGCCCTCTCCCTACCT	1306
361	R I N I S F T D Q P I L L S L Y G T H N E V Q D I A L S L P	390
1307	GACATGTCAACCAACAAAACCATCTCGTTCCAGGTGACCACCGATGTGGACATTGGAGACCTTCTCATGGTGAAAGATGAAAATGGGAGAAG	1396
391	D M S T N K T I S F Q V T T D V D I G D L L M V K M K W E K	420
1397	GATTCGTACTTCGGCTGGTCCGACTGGTGGGGAAGCAACGACTTCAAGATCCGCAAGCTCAGAGTGAAGGCGGGAGAAACGCAAGAAAAG	1486
421	D S Y F G W S D W W G S N D F K I R K L R V K A G E T Q E K	450
1487	GTGGTGTTCAGTGCCAAAGATGGCGAGTTTGCAGATCTGAAGAGAGGAGGGGGGCGTTTCTATCTTTGTGAAATCTAAAGAAGACCAGGTT	1576
451	V V F S A K D G E F A D L K R G G D V S I F V K S K E D Q V	480
1577	CGCAAGAGGCATGCAAGGCATCACGAACGCAAAAGACCTGCTAAGTGCTGGATGAACTCCAATTGAATACGATGCAAAGAATGAAAAAGC	1666
481	R K R H A R H H E R K R P A K C W M N S N ***	501
1667	AATATTGCCTTGATATGGATTATTAAATA <u>AATAAA</u> TGGAAGCAAAAAAAAAAAAAA	1722

图 1 中华鲟 LPL cDNA 全序列

Fig. 1 The LPL gene sequence of Chinese sturgeon (Acipenser sinensis)

起始密码子(ATG)粗体表示;终止密码子(TGA)用"*"表示;多聚腺苷酸信号序列(AATAAA)以下划线表示。

The ATG start codon is bold and TGA translation stop codon is indicated by asterisk (*). The underlined (AATAAA) is polyadenylation signal.

GTAAACTCTTGAGAGAAACTCTGGATATAACACATCCAAAGCAGCTGCTACCCCCAACTGGAATATTAATT 71 1 72 CTGCTGTAACATTATAAATACCCGGATCTCAACGGCTTCTAATACAAATTAATAAGTATCTGCATCCGTGATCATTATAAATTCTATTAAA 161 162 **ATG**GGGAGAGTAAGCAGCGCTTGTTTTATATCATGGATGTATTTCGCCTACATTTGCTCGGGTTTTGAAACCACAGTTGAGCCAACGAGT 251 M G R V S S A C F I S W M Y F A Y I C S G F E T T V E P 30 1 TS GAATCTACCGCTTTTAGTAACTTAATGGAAAATGCCACAGAATGGATGATGGACCTCACCGACATTGAGTCCAAGTTTTCCTTTAGGAAT 252341 31 E S T A F S N L M E N A T E W M M D L T D T E S K F S F R T 60 342 AGCGAAGAACCCGAAGAAGATCTGTGCTACATAGTTCCAGGTCAACCCCAAACAATCAAAGAGTGTAACTTCAATCCAGACTCCAAGACT 431 61 S E E P E E D L C Y I V P G Q P Q T I K E C N F N P D S K 90 Т 432 TTCATAGTTATTCATGGATGGTCGGTCACCGGTATGTTTGAGAGCTGGGTACCCCAAACTGGTAACAGCCCTGTATGAACGAGAGCCAACA 521 FIVIHGWSVTGMFESWVPKLVTALYEREP 91 120 522 GCCAATGTGATTGTGGTGGACTGGTTGTCCCGAGCGCAACAACATTACCCAACGTCAGCCGCTTACACCAAACTAGTGGGCAAGGATGTG 611 121 A N V I V V D W L S R A Q Q H Y P T S A A Y T K L V G K D 150 612 GCCATGTTGTTAACTGGTTACAGGCTGAGATTGACTATCCTTGGGATAAACTGCATCTGTTGGGCTTCAGTCTTGGCGCTCATGTAGCA 701 A M F V N W L Q A E I D Y P W D K L H L L G F S L G A H V A 180 151 702 GGAATCGCTGGCCTTCTCACCAAACATAAGGTTAACAGAATCACAGGCATGGATCCTGGCCCTAGCTTTGAGTACGCAGATGCCCAA 791 G T A G L L T K H K V N R T T G M D P A G P S F F Y A D A Q 181 210 AGCACTCTTTCCCCAGATGATGCCCTTTTCGTGGACGTTCTTCACACCAACACTCGCGGCTCTCCGGATCGCAGTATTGGGATTCAGAGG 792 881 STLSPDDALFVDVLHTNTRGSPDRSIGIQR 211 240 882 971 PVGHIDIYPNGGTFQPGCDLQNTVLMVATT 270 241 972 GGTTTAAGAAACATGGATCAGATTGTGAAGTGCTCCCATGAGCGGGCCATCCACCTGTTCATCGACTCACTGGTGAACCAGGAGCAACAA 1061 271 G L R N M D Q I V K C S H E R A I H L F I D S L V N Q Е Q Q 300 AGCTTGGCTTACCGCTGCAGCTCCAAAGACAGCTTCAACAAAGGCATGTGCCTCAGCTGCCGCAAGAATCGGTGCAACAAGGTGGGATAC 1062 1151 301 S L A Y R C S S K D S F N K G M C L S C R K N R C N K V G Y 330 1152 ${\tt GGTGTGAACAAAATTCGCACACGCAGGAGCTGCAGAATGTATATGAAGACCAGAAACATGATGCCATATAAAGTTTTCCATTATCAAGTG}$ 1241 331 G V N K I R T R R S C R M Y M K T R N M M P Y K V F H Y Q V 360 1331 1242 K V H F F S K S T I S Y T D Q P I K I S L Y G I H G E K E N 390 361 1332 1421 391 I P Y V M P A L N T N S T V S F L L T T D T D I G E L L M V 420 1422 AAACTTCTCTGGGAGAAAGACTCCCTCATCAGCTGGCCCTGGTGGAACCCTGATACCTTTCACATTCGCAAATTACGCATCAAATCAGGA 1511 K L L W E K D S L I S W P W W N P D T F H I R K L R I K 421 S G 450 1512GAGACACAATCTAAGGTCATCTTCCGTGCAAAAGAAGGTGAATTTTCCTACCTTTCCCGTGGAGGTGAGGCTGCCATCTTCGTGAAAGAC 1601 E T Q S K V I F R A K E G E F S Y L S R G G E A A I F V K D 451 480 1602 1691 481 KEAQSSRKNQRLHKLKMNGSSFKQNTE*** 507 1692 ACATCGAAATCCACCTCTGCTGGGATCTGGCACGGAATTTGCCAGGGAAACTGGAATGGTAGAAACTGACTTCTCCCCATATATTCGGACT 1781 1782 CGTAACCTTCACCCGACCCAAATCCAGAAACACATCCTGCAAGAAACCGCATCTTGAAAATGTTACTGCTGTGCAGTTTTAAAACAAAAA 1871 AATCACTTCGGATACTGCTCAAGACACATTGCAGGTCTTGTGAGACAATCTTTAATGAAATCATTTAATCCATAAAAAGATAATCATGTC 1961 1872 1962 TCTATGCAATATATTTATACAAGTAATCAGTTTTAGTCTGAAAGGACTTGCACTTAGTTAACAGGGTTTGCTAGTTGTCCACCAAAGAGA 2051 2052 CTTTCCTTTCTGGAGAAAGATGCCATTCAAAACATGTTACTATTCGTTTGGTTTACGATATTATTCTTGAAATTCTACTTAGAGACTAA 2141 2142 ACATCTAAGGTTATTTAGCTGTTTGTTTGGCTGTACTGTGAATTAGGTTGTACCAATGCGGTTTCCTAGCTATGCTAATCCTCTTTGCCT 2231 2251 2319

图 2 鲢 LPL cDNA 全序列

Fig. 2 The LPL gene sequence of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)

起始密码子(ATG)粗体表示;终止密码子(TAA)用"*"表示;多聚腺苷酸信号序列(AATATA)以下划线表示。 The ATG start codon is bold and TGA translation stop codon is indicated by asterisk (*). The underlined (AATATA) is polyadenylation signal.

2.2 中华鲟HL基因cDNA全序列及鲢、鳙、草鱼、 鲮鱼、尼罗罗非鱼和斑鳢HL基因cDNA核心 序列克隆与分析

测序得到中华鲟、鲢、鳙、草鱼、鲮鱼、尼罗 罗非鱼和斑鳢 HL cDNA 核心序列,长度分别为: 1043 bp、672 bp、1068 bp、1068 bp、672 bp、1060 bp 和 467 bp,分别编码 347、224、356、356、224、 353 和 155 个氨基酸,将测序得到的序列在 NCBI 网站上 BLAST 确认。GenBank ID 分别为 FJ436062、 FJ436082、FJ436087、FJ436064、FJ436086、FJ436083 和 FJ436085。 5'RACE 和 3'RACE 技术分别从中华鲟肝脏获 得 2 个预期片段大小的 PCR 产物,对这 2 个片段进 行克隆、测序,分别得到 568 bp 和 440 bp 的 cDNA 片段。通过序列拼接,确定中华鲟 HL 基因 cDNA 全长 1780 bp。序列分析表明,起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA, polyA 加尾信号为 AATAAA。 ORF长1500 bp,5'-UTR长118 bp,3'-UTR长162 bp, 编码 499 个氨基酸,推测的蛋白质相对分子质量为 56.3 k,等电点为 9.00(图 4)。在推测氨基酸序列中 也发现催化位点、脂质结合位点、保守的半胱氨酸 残基位点和糖基化位点(图 5)。

Chinese Sturgeon LPL	(1)	MGREKNALLAIVWIYLLKTCASFSNTTTEATLLTNSTEWVVDYSSIESKFSLRTPELPDDDTCYLVPGQPETIA					
Tilapia LPL	(1)						
Silver carp LPL	(1)	<u>MGRVSSACFISWMYFAYICSGFE</u> TTVEPTSESTAFSNLMENATEWMMDLTDIESKFSFRISEEPEEDLCYIVPGQPQTIK					
Grass carp LPL	(1)						
Bighead carp LPL	(1)						
Taiwan snakehead LPL	(1)						
MUG CATP LPL	(1)						
Chinese Sturgeon LPL	(75)	QCKENQTIKTEVVIHGWTVTGLEESWIPKLVSALVEREPHSNVIVVDWLHRAQQHYPTSAAYTELVGQDVAKEVDWMESQ					
Tilapia LPL	(1)	KTFIVIHGWTVTGMFESWVPKPVSALYDRVPTANVIVVDWLTRANOHYPTSAAYTKLVGRDVAKFVTWIQNE					
Silver carp LPL	(81)	ECNFNPDSKTFIVIHGWSVTGMFESWVPKLVTALYEREPTANVIVVDWLSRAQQHYPTSAAYTKLVGKDVAMFVNWLQAE					
Grass carp LPL	(1)	KTFIAIHGWSVTGMFESWVPKLVTALYEREPTANVIVVDWLSRAQQHYPTSAAYTKLVGKDVAMFVNWLQAE					
Bighead carp LPL	(1)	KTFIVIHGWSVTGMFESWVPKLVTALYEREPTANVIVVDWLSRAQQHYPTSAAYTKLVGKDVAMFVNWLQAE					
Taiwan snakehead LPL	(1)	KTFIVIHGWTVTRMFESWVPKLVSALYEREPSANVIVVDWLTRANQHYPTSAAYTKLVGRDVAKFVVRIQKE					
Mud carp LPL	(1)	KTFIVIHGWTVTGMFESWVPKLVTALYDREPTANVIVVDWLSRAQQHYPTSAAYTKLVGRDVAKFVNWLQGE					
		*** **** ** **** ** * *** * *					
Chinese Sturgeon LPL	(155)	$INYPLEM \underline{FHLLGYSLG} AHVAGIVGSLTNNKVNRITGLDPAGPTFEYAEE QRRLSPDDANFVDVLHTYTRGSPDRSIGIQK$					
Tilapia LPL	(73)	LQLPWDR <u>VHLLGYSLG</u> AHVAGIAGDLTNHKISRITGLDPAGPTFEHADEQSTLSRGDAQFVDVLHTNTRGSPDRSIGIQR					
Silver carp LPL	(161)	IDYPWDK <u>LHLLGFSLG</u> AHVAGIAGLLTKHKVNRITGMDPAGPSFEYADAQSTLSPDDALFVDVLHTNTRGSPDRSIGIQR					
Grass carp LPL	(73)	IDYPWEK <u>LHLLGFSLG</u> AHVAGIAGLLTKHKVNRITGMDPAGPSFEYADAQSTLSPDDALFVDVLHTNTRGSPDRSIGIQR					
Bighead carp LPL	(73)	IGYPWEKL <u>HLLGFSLG</u> AHVAGIADLLTKHKVNRITGMDPAGPSFEYADAQSTLSPDDALFVDVLHTNTRGSPDRSIGIQR					
Taiwan snakehead LPL	(73)	LQSPWDR1HLLGYSLGAHVAG1AGDLTDHK1SR1TGLDPAGPTFEHADDQSTLSRDDAQFVDVLHTNTRGSPDRS1G1QR					
Mud carp LPL	(73)	IGYPWEKLHLLGYSLGAHVAGIAGLLTKHKVNRITGMDPAGPSFEYADAQSTLSPDDALFVDVLHTNTRGSPDRSIGIQR					
		* **** ********* ** * **** **** ** * * *					
Chinese Sturgeon LPL	(235)	PVGHVDIYPNGGVF0PGCDLHKAMLMIAANGFADMD0IVKCSHERSIHLFIDSLLNEEKPSMAYRCNTKEAFDKGLC					
Tilania LPL	(153)	PVGHIDIVPNGGTFOPGCDIONTLMGIALEGIKGLONMDOLVKCSHERSIHLFIDSLINIFQQSVAFRONSKDTFNKGMC					
Silver carp LPL	(241)	PVGHIDIVPNGGTFQPGCDLQNTVLMVATTGLRNMDQIVKCSHERATHLFIDSLVNQFQQSLAVRCSKDSFNKGMC					
Grass carp IPI	(153)	PVCHIDIVPNCCTFOPCCDIONTMI MVATTCI RNMDOIVKCSHERAIHI FIDSI VNOFOOSI AVROSSKESENKCM					
Bighoad carp IPI	(153)	PVCHIDITINGGTI QI GCDLQATMEMINITIOEN AMDQIVACCHERATHEI IDDE MQEQQEATROSALDI MAGM					
Teimen analahaad IDI	(153)						
Mud comp I PI	(153)	LACUTATA AND CLEVECTOR ALTERING TO FOR AN AND A CARACTERSTILLING TA AND A CARACTER AND A C					
muu caip LiL	(100)	**** ******					
N-terminal domain C-terminal domain							
Chinese Sturgeon LPL	(312)	LSORKNRONTLGYDVNKVRNKRSARMYLKTREVMPYKVFHFQIKVHFFNRINISFTDQPILLSLYGTHNEVQDIALSLPD					
Tilapia LPL	(233)	LSCRKNRCNKIGYNVKKVRTARSTRMYLKTRGMMPFKVFHYQVKVHFF					
Silver carp LPL	(318)	LSCRKNRCNKVGYGVNKIRTRRSCRMYMKTRNMMPYKVFHYQVKVHFFSKSTISYTDQPIKISLYGIHGEKENIPYVMPA					
Grass carp LPL	(230)	LSCRKNRCNKVGYGVNKIRTRRSSRMYMKTRDMMPYKVFHYQVKVHFF					
Bighead carp LPL	(230)	LSORKNRONKVGYGVNKIRTRRSSRMYMKTRDMMPYKVFHYQVKVHFF					
Taiwan snakehead LPL	(233)	LSORKNRONKLGYNINKVRTSRSAKMYLKTREMMPYKVFHYQVKVHFF					
Mud carp LPL	(170)						
Chinese Sturgeon LPL	(392)	MSTNKT I SEQVIT DVDI GDI I MVKMKWEKD SYFGWSDWWGSNDEK I RKI RVKAGET QEK VVFSAKDGEFADI KRGGDVSI					
Tilapia LPL	(281)						
Silver carp LPL	(398)	LNTNSTVSFLLTTDTDIGELLMVKLLWEKDSLISW-PWWNPDTFHIRKLRIKSGETØSKVIFRAKEGEFSYLSRGGEAAI					
Grass carp LPL	(278)	·					
Bighead carp LPL	(278)						
Taiwan snakehead LPL	(001)						
Mud carp LPL	(281)						
·····	(281) (170)						
Chinese Ctores IDI	(281) (170)						
Chinese Sturgeon LPL	(281) (170) (472) (281)	FVKSKEDQVRKRHARHHERKRPAKCWMNSN-					
Chinese Sturgeon LPL Tilapia LPL Silver carp LPL	(281) (170) (472) (281) (477)	FVKSKEDQVRKRHARHHERKRPAKCWMNSN-					
Chinese Sturgeon LPL Tilapia LPL Silver carp LPL Grass carp LPL	(281) (170) (472) (281) (477) (278)	FVKSKEDQVRKRHARHHERKRPAKCWMNSN- FVKDKEAQSSRKNQRLHKLKMNGSSFKQNTE					
Chinese Sturgeon LPL Tilapia LPL Silver carp LPL Grass carp LPL Bighead carp LPL	(281) (170) (472) (281) (477) (278) (278)	FVKSKEDQVRKRHARHHERKRPAKCWMNSN- FVKDKEAQSSRKNQRLHKLKMNGSSFKQNTE					
Chinese Sturgeon LPL Tilapia LPL Silver carp LPL Grass carp LPL Bighead carp LPL Taiwan snakehead LPL	(281) (170) (472) (281) (477) (278) (278) (278) (281)	FVKSKEDQVRKRHARHHERKRPAKCWMNSN- FVKDKEAQSSRKNQRLHKLKMNGSSFKQNTE					
Chinese Sturgeon LPL Tilapia LPL Silver carp LPL Grass carp LPL Bighead carp LPL Taiwan snakehead LPL Mud carp LPI.	(281) (170) (472) (281) (477) (278) (278) (278) (281) (170)	FVKSKEDQVRKRHARHHERKRPAKCWMNSN- FVKDKEAQSSRKNQRLHKLKMNGSSFKQNTE					

图 3 硬骨鱼鲟形目中华鲟和鲤形目、鲈形目鱼类 LPL 氨基酸序列

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of LPL of acipenseriformes, cypriniformes and perciformes

*表示相同的氨基酸;信号肽以下划线表示;推测的糖基化位点用阴影表示;脂质结合位点用双下划线表示;多肽"盖"用方框标出,催 化中心三联体位点用"#"标出;"△"标出二聚体形成位点;保守的半胱氨酸位点用白字黑底表示;"-"表示比较时必要的氨基酸缺失;"↓" 标出 N-末端和 C-末端界限。

The conserved residues in all sequences are indicated by asterisk (*). Putative signal peptide is underlined. Potential N-linked glycosylation sites are boxed in gray squares. Putative lipid-binding region are double underlined. Polypeptide "lid" is boxed. Catalytic triad is marked in "#". Formation sites of dimer are marked in " \triangle ". Conserved Cys residues are typed in white letters on black. "-" indicate amino acid gaps that are necessary to align these sequences. "L"marks the limit of N-terminus and C-terminus domains.

GAGATCTGTGCTACATAACTGGTTGCTG **ATG**GGCATTGTCAGGGGGCTTGTCTTCATCTTGTTCATTTATCACATAAGTGACGCAAAGAGGCTTTTGGTGAACAAAACTGACACAAAA M G I V R G L V F I L F I Y H I S D A K R L L V N K T D T K GACAAATCTCAACCAATTCTGAAACAAAAAGTTCATTATGTCCCAAAATCCAACTTCCGCTTGTACACCAGTGGGGATGCCATGGATGAT D K S Q P T L K Q K V H Y V P K S N F R L Y T S G D A M D D T C T I L P F D S G T L D R C S F N S T A P L V I I V H G W S V D G M L E S W V T K L A A A L K S K L R Y S N V V T A D TGGCTCTCCCTCGCTCATCAGCACTATGCAATAGCAGTGCAGAACACACGGCTGGTCGGCCAGGAGATCGCAGACTTGTTGGAATGGCTG W L S L A H Q H Y A T A V Q N T R L V G Q E T A D L L E W L F F S H Q F S T F N V H L T G Y S L G A H V S G F A G S Y V AGCGGCTCCAGGAACATTGGAAGAATTACAGGCCTGGACCCTGCAGGTCCACTATTCGAAGGAATGTCCTACACTGACCGGCTGTCTCCT S G S R N I G R I T G L D P A G P L F E G M S Y T D R L S P D D A N F V D A T H T F T O O H M G L S V G T K O P V A H Y GACTTCTACCCGAACGGAGCACCTTTCCAACCTGGCTGTCACATCAAGAATTTGTATGATCACCTGTCTCAATATGGACTGTCAGGTTTT D F Y P N G A P F Q P G C H I K N L Y D H L S Q Y G L S G F CAGCAGAATGTGAAATGTGCACACGAGAGATCTGTGCACCTCTTTATTGACTCTCTGTTGAACGATGACAAGCAGAGCATGGCCTACTGG Q Q N V K C A H F R S V H L F T D S L L N D D K Q S M A Y W 1019 TGCAATGACAACAAGTCCTTTGACAAGGGCATCTGCCTGGACTGCCGCAAGAACCGCTGCAACACGCTGGGCTACAACAACATCAAGAAGGTC C N D N K S F D K G I C L D C R K N R C N T L G Y N I K K V 1109 CGAACCGGAACCAGCAAAAGACTGTATCTAAAGACACGCTCCCACATGCCTTACAAAGTCTATCACTACCAGTTCAAAGATCCAATTCATC 1198 R T G T S K R L Y L K T R S H M P Y K V Y H Y O F K I O F I 1199 AACCAAATTGCGCAGCTGGAACCCATGCTTACTATATCTCTGATGGGTACAAAAGAAGATGTTCAAAACTTGCCAATCACTCTAGTTGAG N Q I A Q L E P M L T I S L M G T K E D V Q N L P I T L V E $1289 \quad \mathsf{GAAATAACTGGCAACAAAAACCTACACTTAACTAATCACACTGGACACAGACATCGGCGACCTGATGGTTCTCAAGTTTAAATGGGAAGGC$ E I T G N K T Y T <u>Z</u> L I T L D T D I G D L M V L K F K W E G 1379 TCTGCAGTTTGGGCCAACATCTGGAACAAGGTCCAGACTATCATGCCTTGGAGAAAAGGAGGGGAAGGGCCCAGAGCTCACTGTGGGGAAGA 1468 S A V W A N I W N K V Q T I M P W R K G G K G P E L T V G R 1469 ATCCGGGTCAAGGCTGGAGAGACACAGAAAAAAACCTCATTCTGCTCTCAGAGCGACGACAGCACCCACATACTGCCGGCTCAAGAGAAA 1558 T R V K A G E T Q K K T S F C S Q S D D S T H T L P A Q E K ACCTTTGTGAGGTGCGAGAGAAACAGCAACAGGGGGAAGAAGAAGAAAACCACACTCGCATGATGAAACCCACTGGTCTGTTACACTTGGTGA T F V R C E R N S N R G K K K T T L A ***

图 4 中华鲟 HL cDNA 全序列

Fig. 4 The HL gene sequence of Chinese sturgeon (Acipenser sinensis)

起始密码子(ATG)粗体表示;终止密码子(TGA)用"*"表示;多聚腺苷酸信号序列(AATAAA)以下划线表示。

The ATG start codon is bold and TGA translation stop codon is indicated by asterisk (*). The underlined (AATAAA) is polyadenylation signal.

物种	鲢	鳊	草鱼	鲮鱼	罗非鱼	斑鳢	真鲷	大鼠	人
Species	Silver carp	Bighead carp	Grass carp	Tilapia	Taiwan snakehead	Mud carp	Red sea bream	Rat	Human
中华鲟									
Chinese sturgeon	75.5	75.5	76.2	79.9	73.2	74.3	77.1	77.6	78.0
鲢 Silver carp		97.5	97.8	95.3	79.3	80.0	79.6	72.9	72.6
鏞 Bighead carp			98.2	95.9	78.2	78.9	78.5	72.2	71.8
草鱼 Grass carp				95.3	78.2	78.9	79.2	72.9	72.6
鲮鱼 Tilapia					85.2	84.6	85.2	79.3	79.3
罗非鱼						<u> </u>	00.6		50.4
Taiwan snakehead						90.4	89.6	70.7	70.4
斑鳢 Mud carp							93.2	72.5	72.1
真鲷 Red sea bream								63.8	60.4
大鼠 Rat									91.8

表 2 鱼类、鸟和哺乳类动物 LPL 氨基酸同源性比较 Tab. 2 Amino acid similarity of the LPL among fish, bird and mammals

Chinese Sturgeon HL Tilapia HL	(1) (1)	MGIVRGLVFILFIYHISD/	AKRLLVNKTDTKDKSQPILKQKVHYV	PKSNFRLYTSGDAMDDTCTIL	PFDSGTLDRCSFNST
Silver carp HL	(1)				
Grass carp HL	(1)				
Bighead carp HL	(1)				
Taiwan snakehead HL	(1)				
Mud carp HL	(1)				
Chinese Sturgeon HL	(81)	APLVIIVHGWSVDGMLESV	WVTKLAAALKSKLRYSNVVIADWLSL	AHQHYAIAVQNTRLVGQEIAD	LLEWLEESHQFSTEN
Tilapia HL	(1)	LPLAIIIHGWSVDGMMESV	WVMRLATAVRTNLIDANVVLTDWLSL	AQQHYPVAVQKTRTVGKDIAH	LLQTLQEHYKYPLRN
Silver carp HL	(1)				
Grass carp HL	(1)	LPLATTINGWSVDGMMDKV	WISRLASALKSSEGSINVVIADWLTL	AHQHYPIAAQNIKIVGQDIAH AHQHYPIAAQNIKIVGQDIAH	LLKWLEDFNQFPLGN
Taiwan snakohoad HI	(1)		WI SKLASALKSSEGSTIVV TADWLTL WVI RI AATI KKNI TDVNVVI TDWI SI	ΔΗΟΗΥΡΙΔΥΟΛΤΡΤΥΛΚΝΙΚΙ ΥΘΟΠΙΑΠ	LERALEDI. KÕL SEGK
Mud carp HI	(1)				
mud carp ne	(1)				
Chinese Sturgeon HL	(161)	VHLIGYSLGAHVSGFAGS	YVSGS-RNIGRITGLDPAGPLFEGMS	YTDRLSPDDANFVDAIHTFTQ	QHMGLSVGIKQPVAH
Tilapia HL	(81)	AHLIGYSLGAHISGFAGS	FLTGQ-EKIGRITGLDPAGPLFEGMS	PTDRLSPDDAEFVDAIHTFTH	ERMGLSVGIKQAVAH
Silver carp HL	(1)			DAKFVDAIHTFTQ	QRMGLSVGIKQPVAH
Grass carp HL	(81)	VHLIGYSLGAHISGFAGS	NLAVSGKTLGRITGLDPAGPLFEGMS	HTDRLSPEDARFVDAIHTFTQ	QRMGLSVGIKQPVAH
Bighead carp HL	(78)	VHLIGYSLGAHISGFAGS	NLAVSGKTLGRITGLDPAGPLFEGMS	HTDRLSPEDARFVDAIHTFTQ	QRMGLSVGIKQPVAH
Taiwan snakehead HL	(81)	AHLIGYSLGAHISGFAGS	YLEGS-EKIGRITGLDPAGPLFEGMS	PTDRLSPDDAEFVDAIHTFTH	ERMGLSVGIKQ
Mud carp HL	(1)			DAKFVDAIHTFTQ	ERMGLSVGIKQPVAH
		Ħ	Ŧ	** *********	********
			LID		
Chinese Sturgeon HL	(240)	YDFYPNGAPFQPGCHI	KNLYDHLSQYGLSGFQQNVKCAHERS	SVHLFIDSLLNDDKQSMAYW	IDNKSFDKGI <mark>C</mark> LD <mark>C</mark> RK
Tilapia HL	(160)	YDFYPNGGDFQPGCDL	QNIYEHISQYGILGFEQTVKCAHERS	SVHLFIDSLLNKDKQSMAYR	SDNSAFDKGV <mark>C</mark> LD <mark>C</mark> RK
Silver carp HL	(29)	FDFYPNGGSFQPGCQLHV	QNIYSHLAQYG IMGFEQTVKCAHERA	VHLFIDSLLNKDKQIMAYK	DNTAFDKGY <mark>C</mark> LDCRK
Grass carp HL	(161)	FDFYPNGGSFQPGCQLHV	QNIYSHLAQYG IMGFEQTVKCAHERA	VHLFIDSLLNKDKQIMAYK	DNTAFDKGY <mark>C</mark> LDCRK
Bighead carp HL	(158)	FDFYPNGGSFQPGCQLHV	QNIYSHLAQYGIMGFEQTVKCAHERA	VHLFIDSLLNKDKQIMAYK	SDNTAFDKGY <mark>C</mark> LDCRK
Taiwan snakehead HL	(156)		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	• •	
Mud carp HL	(29)	FDFYPNGGSVQPGCQLHV	QNIYAHLAQYG IMGFEQTVKCAHERA	VHLFIDSLLNKDKQIMAYK	DDTAFDKGN <mark>C</mark> LD <mark>C</mark> RK
-		N-terminal d	lomain ↓	C-terminal domain	
Chinese Sturgeon HL	(318)	NR <mark>C</mark> NTLGYNIKKVRTGTSJ	KRLYLKTRSHMPYKVYHYQFKIQFIN	QI AQLEPMLT ISLMGTKEDVQ	NLPITLVEEITGNKT
Tilapia HL	(238)	NR <mark>C</mark> NTLGYDIKKVRTGTSJ	KRLYLKTRSRMPYKLYHYQFRIQFVN	QT <mark>EKVEPSLT ISLTGTKEESG</mark>	AVDITFNEKISGNKT
Silver carp HL	(109)	NR <mark>C</mark> NTLGYD1KKVRTGTSI	KRLFLRTRSHMPYKLFHYQFRIQFIN	QTDKIDPTLTVSLTGTLGESE	NLPITLVEEISGNKT
Grass carp HL	(241)	NR <mark>C</mark> NTLGYDIKKVRTGTSH	KRLFLKTRSHMPYKLFHYQFRIQFIN	QTDKIDPTLTVSLTGTLGESE	NLPITLVEEISGNKT
Bighead carp HL	(238)	NRCNTLGYDIKKVRTGTSI	KRLFLRTRSHMPYKLFHYQFRIQFIN	QTDKIDPTLTVSLTGTLGESE	NLPITLVEEISGNKT
Taiwan snakehead HL	(156)				
Mud carp HL	(109)		KRLFLKTRSRMPYKLFHYQFRIQFIN	QIEKIDPILILSLIGIMGESE	SLPMILVKEISGSKT
Chinese Sturgeon HL	(398)	YTLLITLDTDIGDLMVLK	FKWEGSAVWANIWNKVQTIMPWRKGG	KGPELTVGRIRVKAGETQKKT	SFCSQSDDSTHILPA
Tilapia HL	(318)	FTFLITLDRDLGELMLLN	MHWEASPLWANMWNTVKT		
Silver carp HL	(189)	FTFLITLDTDIGDLMIMS	FTWEGSHMWANMWNTVKT		
Grass carp HL	(321)	LTFLITLDTDIGDLMIMR	FTWEGSPMWANMWNTVKT		
Bighead carp HL	(318)	FTFLITLDTDIGDLMIMR	FTWEGSPMWANMWNTVKT		
Taiwan snakehead HL	(156)				
Mud carp HL	(189)	FTFLITLNTDIGDLMMMRI	LTWEGSPMWANMWNTVKT		
Chinese Sturgeon HL	(478)	QEKTFVRCERNSNRGKKK	TTLA		
Tilapia HL	(354)				
Silver carp HL	(225)				
Grass carp HL	(357)				
Bighead carp HL	(354)				
Taiwan snakehead HL	(156)				
Mud carp HL	(225)				

图 5 硬骨鱼鲟形目中华鲟和鲤形目、鲈形目鱼类 HL 氨基酸序列

Fig. 5 Amino acid sequence alignment of HL of acipenseriformes, cypriniformes and perciformes

相同的氨基酸用"*"标出;信号肽以下划线表示;推测的糖基化位点用阴影表示;脂质结合位点用双下划线表示;多肽"盖"用方框标出; 催化中心三联体位点用"#"标出;"△"标出二聚体形成位点;保守的半胱氨酸位点黑底白字表示;"-"表示比较时必要的氨基酸缺口;"↓"标出 N-末端和 C-末端界限。

The conserved residues in all sequences are indicated by asterisk (*). Putative signal peptide is underlined. Potential N-linked glycosylation sites are boxed in gray squares. Putative lipid-binding region are double underlined. Polypeptide "lid" is boxed. Catalytic triad is marked in "#". Formation sites of dimer are marked in " \triangle ". Conserved Cys residues are typed in white letters on black. "-" indicate amino acid gaps that are necessary to align these sequences. " \downarrow "marks the limit of N-terminus and C-terminus domains.

2.3 LPL、HL 氨基酸序列同源性分析

比较人、鼠、鸟和不同鱼类的 LPL 一级结构, 发现鱼类 LPL 氨基酸序列与哺乳类动物有 60.4%~ 79.3%同源性,与鸟类有 62.5%~80.9%同源性(表 2)。其中,硬骨鱼鲟形目中华鲟与哺乳动物、鸟类 和其它鱼类同源性分别为 77.6%~78.0%、80.9%、 73.2%~79.9%;硬骨鱼鲈形目鱼类与哺乳类动物同 源性为 60.4%~72.5%;鲤形目鱼类与哺乳类动物有 71.8%~79.3%同源性;与其亲缘远近关系相一致 (表 2),表明 LPL 在进化过程中相对保守。 比较哺乳动物和不同鱼类的 HL 一级结构,发现鱼类 HL 氨基酸序列与哺乳类动物有 52.7%~66.9%同源性。其中,硬骨鱼鲟形目中华鲟与哺乳动物同源性为 64.5%~66.9%,与其他鱼类同源性 70.1%~76.3%;硬骨鱼鲈形目鱼类与哺乳类动物同 源性为 52.7%~64.7%;鲤形目鱼类与哺乳类动物有 56.9%~63.1%同源性(表 3);表明 HL 在进化过程中 也相对保守,但与 LPL 相比,进化上 LPL 较 HL 更为保守。





Fig. 6 The phylogenetic tree of LPL, HL, PL and EL

利用 Neighbor-Joining(NJ)法构建系统发生树,靴带值重复1000次(The tree was constructed by NJ method and the bootstrap consensus inferred from 1000 replicates)。本研究克隆 LPL、HL 基因分别用▲和◆标出(LPL and HL genes cloned in our study are indicated by ▲ and ◆); LPL 基因 GenBank 序列号如下(GenBank accession numbers for LPL): 小鼠(mouse): NM_008509; 大鼠(rat): NM_012598; 人(human): NM_000237; 大口黑鲈(large mouth bass): FJ_436090; 真鲷(red sea bream): AB243791; 金头鲷(bilthead sea bream): AY495672。HL 基因 GenBank 序列号如下(GenBank accession numbers for HL): 人(human): NM_000236; 小鼠(mouse): X58426; 大鼠(rat): NM_012597; 大口黑鲈(large mouth bass): FJ436063; 真鲷 (red sea bream): AB252855。PL 基因 GenBank 序列号如下(GenBank accession numbers for FL): 人(human): NM_0012597; 大口黑鲈(large mouth bass): FJ436063; 真鲷 (red sea bream): AB252855。PL 基因 GenBank 序列号如下(GenBank accession numbers for FL): 人(human): NM_013161; 真鲷(red sea bream): AB252856)。EL 基因 GenBank 序列号如下(GenBank accession numbers for EL): 人(human): NM_006033; 小鼠(mouse): NM_010720; 大鼠(rat) : MM 001012741; 斑马鱼(zebrafish): NM 200128。

				·	0					
物种	鲢	鳙	草鱼	鲮鱼	罗非鱼	斑鳢	真鲷	大鼠	小鼠	
Species	Silver carp	Bighead carp	Grass carp	Tilapia	Taiwan snakehead	Mud carp	Red sea bream	Rat	Mouse	
中华鲟	76.3	72.2	71.0	70.1	72.2	72.0	71.8	64.5	66.0	
Chinese sturgeon		12.2	/1.9	/0.1	12.2	72.9	/1.8	04.5	00.9	
鲢 Silver carp		98.7	97.8	90.6	78.6	10.4	74.1	58.2	61.3	
鳙 Bighead carp			98.6	91.1	74.7	68.0	73.2	59.2	63.1	
草鱼 Grass carp				91.1	74.7	75.0	70.3	58.7	62.3	
鲮鱼 Tilapia					77.2	13.5	73.7	56.9	59.6	
罗非鱼						05.2	94.7	59.6	(2.5	
Taiwan snakehead						83.2	84.7	38.0	02.3	
斑鳢 Mud carp							87.1	63.5	64.7	
真鲷										
Red sea bream								52.7	53.3	
大鼠 Rat									86.1	

表 3 鱼类和哺乳类动物 HL 氨基酸同源性比较 Tab. 3 Amino acid similarity of the HL among fish and mammals

2.4 LPL、HL、EL、PL 系统进化分析

LPL、HL、EL 和 PL 同属脂肪酶家族,将其氨基酸序列构建系统发生树,发现四者聚集成一有根树,起源于共同的祖基因(图 6)。所有的硬骨鱼类、哺乳动物和鸡 LPL 序列聚集成一簇,鸡与硬骨鱼中华鲟先聚为一枝,然后和更为进化的硬骨鱼鲤形目、鲈形目 LPL 成另外独立的分枝,与哺乳动物处于邻近分枝;而所有的 HL 聚集成另外一簇,且硬骨鱼中华鲟和更为进化的硬骨鱼鲤形目、鲈形目HL 成另外独立的分枝,与哺乳动物处于邻近分枝,与可能引动物处于邻近分枝,与哺乳动物处于邻近分枝,与它们在鱼类分类学上的亲缘远近关系一致。

3 讨 论

LPL、HL 同属于脂肪酶家族,直接参与脂类代谢过程。LPL 与机体的脂质代谢及肥胖与否密切相关。激素、禁食、补饲、高脂食物都会引起 LPL mRNA 的特异表达(Liang et al, 2002a)。HL 在功能上与 LPL 非常相似,对血浆脂质转运有重要作用,主要参与高密度脂蛋白的重构和乳糜微粒残骸、低密度脂蛋白的代谢以及胆固醇的逆向转运(Kuusela et al, 1997)。两者在生理功能上的重要性,决定了其在进化过程中的相对保守。此外,在现代系统发生学研究中,研究的重点已不再是生物的形态学特征或是其他特性,而是生物大分子的特征。分子进

化研究有助于阐明物种进化的分子基础和探索基因的起源,从基因进化的角度研究基因序列与功能的关系(Tautz et al, 2003)。

本研究成功克隆中华鲟、鲢 LPL 基因和中华鲟 HL 基因 cDNA 全序列, 及鲢 HL、鳙、草鱼、鲮鱼、 尼罗罗非鱼、斑鳢 LPL 和 HL 基因核心序列。中华 鲟、鲢肝脏 LPL 及中华鲟 HL 氨基酸序列,分别含 有一段长度为23、23、19个氨基酸的信号肽。LPL 和 HL 都有两个结构域: N-末端和 C-末端结构域 (Van Tilbeurgh et al, 1994)。中华鲟等淡水鱼类 LPL、 HL 基因编码的氨基酸序列比较均发现 LPL 催化位 点、脂质结合位点、半胱氨酸残基和 N-糖基化位点 等保守区域。其中, Ser-Asp-His 组成的催化中心三 联体在真骨鱼类和其它脊椎动物的 N-末端区高度 保守,此位点负责催化水解甘油三酯(triglyceride, TG) (Raisonnier et al, 1995)。LPL、HL 均属于 N-连 接糖蛋白类,不同物种 LPL、HL 所具有的潜在 N-糖基化位点(Asn-Xaa-Ser/Thr)的数目和位置是不同 的(Struck & Lennarz, 1980; Mclean et al, 1986) (图3, 5)。相同的保守区域,说明 LPL 与 HL 基因可能起 源于共同的祖先,有着相似的作用机制。

序列同源性分析显示,硬骨鱼鲟形目中华鲟 LPL 与哺乳动物、鸟类和其它鱼类 LPL 亲缘远近关 系相差不大。鲤形目鱼类 LPL 与哺乳类动物 LPL 有 71.8%~79.3%同源性, 鲈形目鱼类 LPL 与哺乳 类动物 LPL 同源性为 60.4%~72.5%, 表明在 LPL 上鲤形目、鲈形目都与哺乳动物接近, 且鲤形目较 鲈形目更近(表 2)。鱼类 HL 氨基酸序列与哺乳类动 物有 52.7%~66.9%同源性。其中,硬骨鱼鲟形目中 华鲟 HL 与哺乳动物 HL 同源性为 64.5%~66.9%, 与其它鱼类同源性 70.1%~76.3%,此结果与它们在 鱼类分类学上的其亲缘远近关系相一致。鲤形目鱼 类 HL 与哺乳类动物 HL 有 56.9%~63.1%同源性, 鲈形目鱼类 HL 与哺乳类动物 HL 同源性为 52.7%~ 64.7%(表 3)。结果显示, 进化上 LPL 较 HL 更为保

参考文献:

- Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K. 1992. Lipoproteinlipase: recent contributions from molecular biology[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 29(3-4): 243-268.
- Kuusela P, Rehnmark S, Jacobsson A, Cannon B, Nedergaard J. 1997. Adrenergic stimulation of lipoprotein lipase gene expression in rat brown adipocytes differentiated in culture: mediation via β 3- and α 1-adrenergic receptors [J]. *Biochem J*, **321**(Pt3): 759-767.
- Liang XF, Ogata HY, Oku H. 2002a. Effect of dietary fatty acids on lipoprotein lipase gene expression in the liver and visceral adiopose tissue of fed and starved red sea bream Pagrus major[J]. Comp Biochem Physiol A, 132(4): 913-919.
- Liang XF, Oku H, Ogata HY, Li YQ, Bai JJ, Luo JR. 2002b. The cDNA Sequence and Tissue Expression of Lipoprotein Lipase Gene of a Marine Fish, Red Sea Bream (*Pagrus major*) [J]. *Chn J Biochem Mol Biol*, **18**(6): 712-719. [梁旭方, Oku H, Ogata HY, 李月琴, 白俊杰, 罗建仁. 2002a. 海水鱼真鲷脂蛋白脂肪酶基因 cDNA 序列与组织表 达. 中国生物化学与分子生物学报, **18**(6): 712-719.]
- Lindberg A, Olivecrona G. 1995. Lipase evolution: Trout, Xenopus and chicken have lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II-like activity but lack hepatic lipase-like activity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1255(2): 205-211.
- Mclean LR, Best S, Balasubramaniam A, Jackson RL. 1986. Fatty acyl chain specificity of phosphatidylcholine hydrolysis catalyzed by lipoprotein lipase. Effect of apolipoprotein C-2 and its (56-79) synthetic fragment [J]. *Biochim Biophys Acta*, 878: 446-449.
- Mukherjee M. 2003. Human digestive and metabolic lipases a brief review [J]. *J Mol Catal*, **22**(5-6): 369-376.

守。这可能由于相对于 LPL, HL 功能的发挥限制 更少(不需要激活剂、不被 SDS 抑制、对底物的特 异性不高),在进化中,虽然来源于共同的原始基因, 但 HL 较 LPL 变异更大。系统发生树显示, LPL、 HL、EL 与 PL 同属脂肪酶家族,四者聚集成一有 根树,起源于共同的祖基因。中华鲟是现存最古老 的脊椎动物,是鱼类的共同祖先——古棘鱼的后 裔,它在鱼类进化乃至脊椎动物进化史上具有特殊 的地位,比较其与多种脊椎动物的 LPL 和 HL 基因 序列,对于揭示脊椎动物原始祖先基因组的结构和 演化过程进而探索基因的起源和分化意义深远。

- Raisonnier A, Etienne J, Arnault F, Brault D, Noe L, Chuat JC, Galibert F. 1995. Comparison of the cDNA and amino acid sequences of lipoprotein lipase in eight species [J]. *Comp Biochem Physiol*, **111**(3): 385-398.
- Struck DK, Lennarz WJ. 1980. The function of saccharide-lipids in synthesis of glycoproteins [M]// Lennarz W J. The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans.New York: Plenum Publishing Corp, 35-84.
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP. 2003. Aplea for DNA taxonomy[J]. Trends Ecol Evol, 18(2): 70-74.
- Van Tilbeurgh H, Roussel A, Lalouel JM, Cambillau C. 1994. Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis[J]. J Biol Chem, 269(6): 4626-4633.
- Wong H, Schotz MC. 2002. The lipase gene family[J]. J Lipid Res, 43(7): 993-999.
- Yamada S, Iida T, Tabata T, Nomoto M, Kishikawa H, Kohno K, Eto S. 2000. Alcoholic fatty liver differentially induces a neutrophil-chemokine and hepatic necrosis after ischemia-reperfusion in rat[J]. *Hepatol*, **32**(2): 278-288.
- Yang F. 2003. Animal Nutrition [M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 76-88. [杨 凤. 2003. 动物营养学. 2版. 北京:中国农业出版 社, 76-88.]
- Zechner R. 1997. The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: Implications for energy and lipoprotein metabolism[J]. Curr Opin Lipidol, 8(2): 77-88.