

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(lipoprotein 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 Lipoprotein 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 evolutionary relationship of fish lipoprotein 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 maculata* 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进, 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)和斑鳢(*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、尼罗罗非鱼和斑鳢快速分离肝脏组织, 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 PCR™ Kit (AMV) Ver.1.1(TaKaRa)试剂盒, 分别以中华鲟、鲢、鳙、草鱼、鲮鱼、尼罗罗非鱼和斑鳢肝脏总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SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)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	CTTCTCTGGCTATCATCAT(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	AGGCTGTTTGATGCCAC
5'RACE	
ASLPL5'R01	AGCCAGTCCACCACGATCACGTT
ASLPL5'R02	TCCAACCTCTCAAACAGCC
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 \times BD Advantage 2 Polymerase MIX 1 μL ，加 PCR-Grade water 至 50 μL 。PCR 反应条件为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min，共 25 个循环；最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min，94 $^{\circ}\text{C}$ 45s，60 $^{\circ}\text{C}$ 45s，72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，共 30 个循环；最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min，94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，57 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，共 30 个循环；最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 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 2319 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	GAGAATATAGAAAGTGAAAGGAGGACTCTGTGCTTAAAGGATAC	46
47	AGCGCAGGCTCAGCAGCAGCATTACTGTAACAGTTAGGTTGGAATACTGCAAAACCAATAGTCTATTTTTCTGGATTTTTCTAACGAAT	136
137	ATGGGAAGAGAAAAATGCTTTATTTGGCGATTGTATGGATATACTGTTAAAAACGTGCGCAAGTTTTTCAAATACTACAACCTGAAGCA	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	ACCCTTTTAACAAACAGCAGCGAGTGGTTCGACTACAGCAGCATCGAATCCAAGTCTCTCTGCGCAGCCTGAACTTCCTGACGAT	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	GACACCTGTTACCTGGTCCCGGGCAACCTGAGACCATCGCGAATGCAAAATCAACCAGACCATAAAGACCTTCGTGGTCCATCACGGG	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	TGGACGGTACTGGCGTGTGAGAGTTGGATCCCAAGCTGGTGTACGCGTGTACGAGAGAGGCCACTCCAACGTGATCGTGGTG	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	GACTGGCTGACCCGAGCGCAGCAGCACTACCCACCTCCGCTGCGTACACTGAGCTAGTGGGCAAGATGTGGCCAAGTTCTGGACTGG	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	ATGGAGAGTCAAATAACCTTTGGAGATGTTTCATCTCGGTATAGTCTCGGAGCTCAGTTGCTGGCATTGTCCGCGAGTCTC	676
151	M E S Q I N Y P L E M F H L L G Y S L G A H V A G I V G S L	180
677	ACAAACAAGGTCAACCGAATCACAGGCTCGATCCGGCCGCCACGTTTGAGTACGCGGAGGAGCAGCGGGCGGCTGCCCGGAC	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	GATGCTAACTTTGGATGTGCTGCACACTACACCGGGCTCCCGGACCGGAGCATTGGTATCCAGAAGCCAGTGGGCCATGGAT	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	ATCTACCCCAATGGGGGGTCTTCAGCCAGGCTGTGATCTGCACAAAGCCATGCTCATGATTGCTGCCAATGGATTGCGAGATATGGAC	946
241	I Y P N G G V F Q P G C D L H K A M L M I A A N G F A D M D	270
947	CAGATCGTGAATGCTCCATGAACGCTCCACCTGTTTCATGCTGATTCGCTGTGAAGAGGAGAACCGAGCATGGCCATCCGCTGC	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	AACACCAAGGAAGCCTTCGACAAGGGGCTCTGCCTGAGCTGCCGCAAGAACCGCTGCAACCCCTGGGCTATGACGTCACAAAGTGAGA	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	AACAAGAGGAGCCAGGATGATCTGAAGACCAGGGAGGTGATGCTTACAAGTTTCCACTTTCAGATCAAGGTGCAATTTCTTCAAT	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	AGGATAAACATCTCTCACAGATCAGCCAATCCTGTTGCTCTGTACGGGACACATAATGAAGTCCAGGACATTGCCCTCTCCCTACCT	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	GACATGTCAACCAACAAACCATCTCGTTCAGGTGACCAAGGATGTGGACATTTGGAGACCTTCTCAGTGAAGATGAAATGGGAGAA	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	GATTCGTAAGTCCGCTGGTCCGACTGGTGGGGAAGCAACGACTCAAGATCCGCAAGCTCAGAGTGAAGGCGGGAGAAACGAAAGAAA	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	GTGGTGTTCAGTCAAGATGGCGAGTTGCGAGATCTGAAGAGAGGAGGGGACGTTCTATCTTTGTGAAATCTAAGAAGACCAAGGTT	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	CGCAAGAGGCATGCAAGGCATCAGCAACGCAAAAGACCTGCTAAGTCTGGATGAACCTCAATGAATACGATGCAAGAAATGAAAAAGC	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	AATATTGCCTTGATGGATTATTAATAAATAAATGGAAGCAAAAAA	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.

```

1          GTAAACTCTTGAGAGAACTCTGGATATAACACATCCAAAGCAGCTGCTACCCCAACTGGAATATTAATT 71
72 CTGCTGTAACATTATAAATACCCGGATCTCAACGGCTTCTAATACAAAATTAAGTATCTGCATCCGTGATCATTATAATTCTATAAA 161
162 ATGGGGAGAGTAAGCAGCGCTTGTTTTATATCATGGATGTTTTCGCCATATTTCCTCGGGTTTGAACCACAGTTGAGCCCAACGAGT 251
1   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 T S 30
252 GAATCTACCGCTTTAGTAACCTAATGAAAATGCCACAGAATGGATGATGGACCTCACCGACATTGAGTCCAAGTTTCTTTAGGATT 341
31   E S T A F S N L M E N A T E W M M D L T D I E S K F S F R I 60
342 AGCGAAGAACCAGAAAGATCTGTCTACATAGTTCAGGTCAACCCAAACAATCAAGAGTGAACCTCAATCCAGACTCCAAGACT 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 T 90
432 TTCATAGTTATTCATGGATGGTCCGGTACCAGTATGTTGAGAGCTGGGTACCCAACTGGTAACAGCCCTGTATGAACAGAGCAACA 521
91   F I V I H G W S V T G M F E S W V P K L V T A L Y E R E P T 120
522 GCCAATGTGATTGGTGGACTGGTGTCCCGAGCGCAACAACATTACCAACGTGAGCCGCTTACACCAAACTAGTGGCAAGGATGTG 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 V 150
612 GCCATGTTGTAACTGGTACAGGCTGAGATTGACTATCCTTGGGATAAACTGCATCTGTTGGGCTTCAGTCTTGGCGCTCATGTAGCA 701
151  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
702 GGAATCGTGGCCTTCTACCAAAACATAAGGTTAACAGAATCACAGGATGGATCCTGCTGGCCCTAGCTTTGAGTACGCAGATGCCAA 791
181  G I A G L L T K H K V N R I T G M D P A G P S F E Y A D A Q 210
792 AGCACTCTTCCCGAGATGATGCCCTTTTCGTGGAGTTCCTCACCAACCACTCGCGGCTCTCCGGATCGCAGTATGGGATTCAGAGG 881
211  S T L S P D D A L F V D V L H T N T R G S P D R S I G I Q R 240
882 CCAGTGGGTACATAGACATCTACCCCAATGGTGGAACTTCCAACCTGGCTGTGACCTCCAGAACACTGTGTGATGGTGGCCACTACT 971
241  P V G H I D I Y P N G G T F Q P G C D L Q N T V L M V A T T 270
972 GGTAAAGAAACATGGATCAGATTGTGAAGTCTCCCATGAGCGGCCATCCACCTGTTCATCGACTACTGGTGAACAGGAGCAACAA 1061
271  G L R N M D Q I V K C S H E R A I H L I D S L V N Q E Q Q 300
1062 AGCTTGGCTTACCGCTGACGCTCCAAAGACAGCTTCAACAAGGCATGTGCCCTCAGCTGCCGCAAGAATCGGTGCAACAQEGGATAC 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 GGTGTGAACAAAATTCGCACACGAGGACTGCAGAATGTATGAAGACAGAAACATGATGCCATATAAAGTTTCCATTATCAAGTG 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
1242 AAGTCCACTTCTCAGCAAGAGCACAATAAGCTACACCCAGCCATTAAGATCTCATTGTGAATCCACGGGGAGGAGAGAAT 1331
361  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
1332 ATCCCTTACGTTATGCTGCTTTAAACACAACTCCCGGTGCTCTCTTTTACCACGGATACAGACATCGGAGAAGTGTGATGGTA 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 AAATCTCTGGGAGAAAGACTCCCTCATCAGCTGGCCCTGGTGGAAACCTGATACCTTTCACATTGCAAAATTACGCATCAAAATCAGGA 1511
421  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 S G 450
1512 GAGACACAATCTAAGTTCATCTCCGTGCAAAAGAGGTAATTTCTACCTTCCCGTGGAGGTGAGGCTGCCATCTTCGTGAAAGAC 1601
451  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 480
1602 AAAGAAGCCAGTGCAGCGCAAAAACAGAGATGCACAAGTGAAGATGAACGGAAGTTCGTTCAACAGAACACAGAGTAAAGGCAC 1691
481  K E A Q S S R K N Q R L H K L K M N G S S F K Q N T E *** 507
1692 ACATCGAAATCCACTCTGTGGATCTGGCAGGAATTTGCCAGGAACTGGAATGGTAGAACTGACTTCTCCATATATTCGGACT 1781
1782 CGTAACCTTACCCGACCCAAATCCAGAACACACTCTGCAAGAAACCGCATCTTGAAAATGTTACTGCTGTGACAGTTTAAAAACAAAA 1871
1872 AATCACTTCGGATACTGCTCAAGACACATTGCAGTCTTGTGAGACAATCTTAAATGAAATCATTTAATCCATAAAAAATAATCATGTC 1961
1962 TCTATGCAATATATTATAAAGTAATCAGTTTATGCTGAAAGGACTTGCACCTAGTTAACAGGGTTTGTAGTTGCCACAAAGAGA 2051
2052 CTTTCTTCTGGAGAAAGATGCCATTCAAACATGTTACTATTGTTGGTTTATCAGTATTATTCTTGAATTTACTACTAGAGACTAA 2141
2142 ACATCAAGGTTATTAGCTGTTGTTGGCTGTACTGTGAATAGGTTGTACCAATGCGGTTTCCTAGCTATGCTAATCTCTTTGCT 2231
2251 CAGTCCGAAAGCAGAACTTTCAGATTTCCTTTGTCAGCTCGAGTCACTGAAATGAAATGCTTTAGCAAAAAAAAAAAAAAAAA 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)。

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类动物同源性为 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。

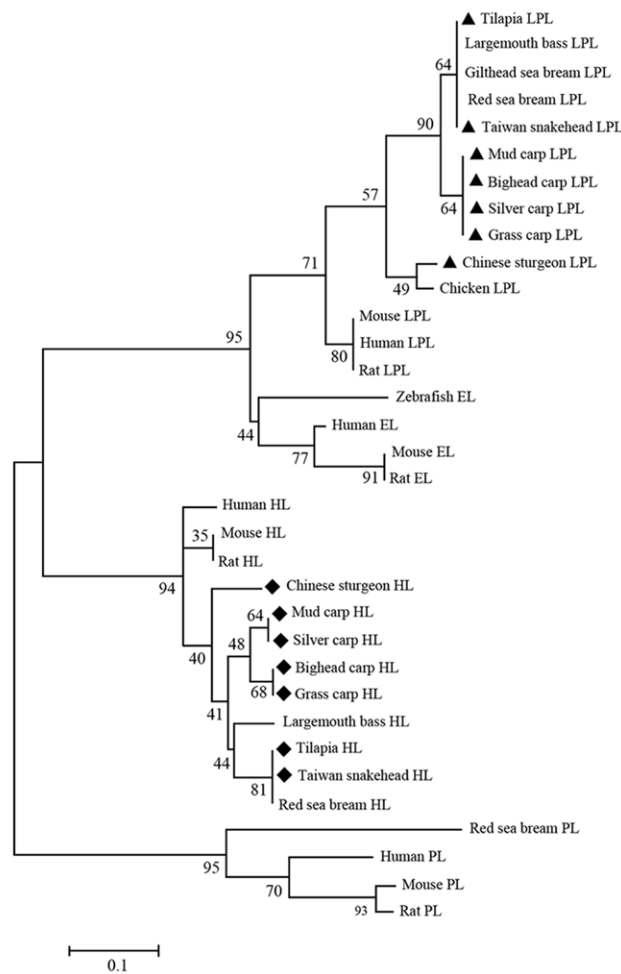


图 6 LPL、HL、PL 和 EL 的系统进化树

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 PL): 人(human): NM_000936; 小鼠(mouse): NM_026925; 大鼠(rat): 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。

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

物种 Species	鲢 Silver carp	鳙 Bighead carp	草鱼 Grass carp	鲮鱼 Tilapia	罗非鱼 Taiwan snakehead	斑鳢 Mud carp	真鲷 Red sea bream	大鼠 Rat	小鼠 Mouse
中华鲟 Chinese sturgeon	76.3	72.2	71.9	70.1	72.2	72.9	71.8	64.5	66.9
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 Taiwan snakehead						85.2	84.7	58.6	62.5
斑鳢 Mud carp							87.1	63.5	64.7
真鲷 Red sea bream								52.7	53.3
大鼠 Rat									86.1

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, 硬骨鱼鲤形目中华鲟 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

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。

参考文献:

- Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K. 1992. Lipoprotein lipase: 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 adipose 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.
- 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]. *Hepatology*, **32**(2): 278-288.
- Yang F. 2003. Animal Nutrition [M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 76-88. [杨 风. 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.