

大口黑鲈脂代谢相关基因 NPY、UCP2、LPL、HL 克隆与分子进化分析

于 燕 梁旭方 李诗盈 廖婉琴

(暨南大学生物工程学系, 广州 510632)

摘要: 采用 RT-PCR 和 RACE 方法克隆了大口黑鲈 NPY 基因 cDNA 全序列及 UCP2、LPL、HL 基因 cDNA 核心片段。序列分析结果表明, 大口黑鲈 NPY 基因 cDNA 全序列长 664 bp, 其中 5' 端非翻译区 (5'-UTR) 长 53 bp, 3' 端非翻译区 (3'-UTR) 长 311 bp, 开放阅读框 (ORF) 长 300 bp, 编码 99 个氨基酸, 即前体 NPY。大口黑鲈前体 NPY 包括三个部分, 28 个氨基酸组成的信号肽、36 个氨基酸组成的成熟 NPY 以及 32 个氨基酸组成的由 Gly-Lys-Arg 指示的 NPY C 端肽 (CPON)。大口黑鲈 UCP2、LPL、HL 基因 cDNA 核心片段长度分别为 737 bp、509 bp 和 666 bp, 各自编码 245 个氨基酸、169 个氨基酸和 222 个氨基酸。将 4 个基因的氨基酸序列分别与其他物种的氨基酸序列进行同源性比较, 并通过 MEGA3 构建系统树, 对这 4 个脂代谢相关基因的分子进化特征进行了探讨。

关键词: 大口黑鲈; NPY; UCP2; LPL; HL; 克隆; 分子进化

中图分类号: Q781.4349 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)06-0900-08

动物体内的脂类主要有三个去路: 贮存在皮下、内脏或脂肪组织; 转化成其他成分; 在线粒体中进行氧化供能。一系列的脂代谢相关基因协同作用, 使这三条途径有机结合, 构成了脂类的营养及代谢网络。脂类是鱼类必须的营养元素之一, 特别是肉食性鱼类所需能量的主要来源^[1], 脂类的摄入、贮存和代谢对鱼类维持正常的生命活动具有重要意义^[2-3]。目前哺乳动物脂代谢相关基因的研究已经有了一些进展, 而鱼类脂代谢相关基因的研究还较少。神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY) 是 1982 年首次从猪脑中分离出来的一种含 36 个氨基酸的单链多肽^[4], 与 Y 肽 (PYY) 和胰多肽 (PP) 十分相似, 故认为同属胰多肽家族。NPY 是由 36 个氨基酸组成的活性多肽, 研究发现, 无论是鱼类还是哺乳动物 NPY 都能够增强食欲, 促进摄食, 从而参与调控脂代谢^[5-7]。解偶联蛋白 2 (Uncoupling protein 2, UCP2) 是 1997 年发现的一种解偶联蛋白, 是线粒体内膜载体家族的一员^[8]。在哺乳动物脂代谢过程中, UCP2 基因的表达与游离脂肪酸 (Free fatty acid, FFA) 密切相关, 并且 UCP2 基因还与肥胖基因连锁^[9]。脂蛋白脂肪酶 (Lipoprotein lipase, LPL) 与肝脂

酶、胰脂酶和内皮脂肪酶高度同源, 同属于脂肪酶基因家族的成员。哺乳动物 LPL 主要功能是催化水解 VLDL 颗粒和乳糜微粒内的甘油三酯, 与机体的脂质代谢及肥胖与否密切相关^[10-11]。肝脂肪酶 (Hepatic lipase, HL) 是一种 N 糖蛋白, 哺乳动物 HL 具有磷酸脂肪酶 A1 和甘油三酯水解酶活性, 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, 是脂蛋白代谢中的关键酶之一^[12-14]。目前 UCP2、LPL、HL 在鱼类脂代谢中的作用还不清楚, 是否与哺乳动物相似, 还需要更加深入的研究。

大口黑鲈 (*Micropodus sinensis*) 是一种温水性淡水鱼类, 原产于北美洲, 是游钓渔业的重要对象。为研究大口黑鲈脂代谢相关基因及其分子进化, 我们克隆了大口黑鲈 4 个脂代谢相关功能基因: NPY 基因 cDNA 全序列以及 UCP2、LPL、HL 基因 cDNA 核心片段, 推测得到其氨基酸序列, 分别与其他物种的氨基酸序列进行同源性比较, 并利用 MEGA3 构建系统进化树。本项工作为进一步深入研究鱼类的脂代谢机制, 促进经济鱼类的水产养殖提供参考。

收稿日期: 2006-10-17 修订日期: 2007-08-29

资金项目: 国家自然科学基金项目 (3067036); 广东省科技计划项目 (2005B20301005); 广东省自然科学基金项目 (031886); 教育部留学回国人员科研启动资金项目

作者简介: 于燕 (1981-), 女, 山东烟台人; 硕士研究生; 主要从事分子生物学研究

通讯作者: 梁旭方, Tel 020-85221497, E-mail: liangxf@jnu.edu.cn

续表

引物 Primer	序列 Sequence
LPL01F	5'-CCAAGACCTTCATAGTGAT(T/C)CATG-GCTGG-3'
LPL02R	5'-GCCTGGCTGGAAGGTGCCTCC(G/A)TT-GGGGTA-3'
HL01F	5'-GATGCCAAGTTGTGGATGC(T/C)AT-TCATAC-3'
HL02R	5'-GGTCTTAACTGTGTTCCACAT(A/G)TT-GGCCCA-3'

1 材料与方法

1.1 实验鱼 大口黑鲈购于广州市石牌市场。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一条链的合成 分离新鲜大口黑鲈大脑及肝脏组织。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 第一条链的合成 使用 TaKaRa RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver. 1.1 试剂盒, 以大口黑鲈脑(用于克隆 NPY 基因 cDNA 全序列)及肝脏(用于克隆 UCP2、LPL、HL 基因 cDNA 核心片段)总 RNA 为模板, oligo(dT)₁₈ 为反转录引物, 操作按试剂盒推荐方法进行。

1.2.2 大口黑鲈 NPY、UCP2、LPL、HL 基因核心片段的克隆 根据已知脊椎动物 NPY、UCP2、LPL、HL 氨基酸序列的保守区域分别设计两条简并引物(表 1)。NPY 基因 PCR 扩增条件为: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 60s, 50℃ 60s, 72℃ 60s, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 5min。UCP2、LPL、HL 基因 PCR 扩增条件均为: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 60s, 40℃ 60s, 72℃ 60s, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 5min。PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳纯化, 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, 阳性克隆由英骏公司进行测序。

表 1 克隆大口黑鲈 NPY、UCP2、LPL、HL 基因所用引物

Tab 1 Primers used for cloning of largemouth bass NPY、UCP2、LPL、HL gene

引物 Primer	序列 Sequence
NPY01F	5'-ATAC(T)CCGGTGAA TCCGGAGAA-3'
NPY02R	5'-ATACCT(G)CTG TCT TGT GA TGAG-3'
NPY5'RT	5'-(P)ACACTGA TGACAGCA-3'
NPY5'S1	5'-GG TCTAGTCCTGAGATTG-3'
NPY5'A1	5'-CGCTGTCTTGTGA TGAGA-3'
NPY5'S2	5'-AGAGCTGCTGCTGAAGGA-3'
NPY5'A2	5'-GAGTAGTACTTGGCTAGC-3'
NPY3'01F	5'-GGACGAGCTAGCCAAGTA-3'
NPY3'02F	5'-GCCCTGAGA CACTACATC-3'
3 sites adaptor primer	5'-CTGA TCTAGAGG TACCGGATCC-3'
UCP201F	5'-TCACCTTCCACTGGACACCGC (T/C/A) AA (A/G) GT-3'
UCP202R	5'-GTGACAAACATAACCCACA (G) TTCCA-3'

1.2.3 大口黑鲈 NPY 基因 5' 端及 3' 端的扩增 根据克隆得到的大口黑鲈 NPY 基因 cDNA 核心片段设计 5'RACE 及 3'RACE 所需引物: NPY 5'RT, NPY5'S1, NPY5'A1, NPY5'S2, NPY5'A2, NPY3'01F, NPY3'02F(表 1)。5'RACE 及 3'RACE 操作参照文献[15]中使用的方法进行。

5'RACE(约 250 bp) 和 3'RACE(约 550 bp) 扩增得到的目的片段回收、纯化后克隆至 pMD 18-T 载体, 转化感受态 *E. coli JM109* 应用 PCR 反应对阳性克隆进行鉴定, 最后由英骏公司对所获得的阳性克隆进行序列测定。

1.3 同源性分析及系统进化树重建 同源序列的搜索在 NCBI BLAST 服务器上进行(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。用 Clustal X 1.81 软件进行序列的对位排列, 并辅以人工校对。用 MEGA3 软件 NJ 法构建 NPY、UCP2、LPL 和 HL 系统进化树。

2 结 果

2.1 大口黑鲈 NPY 基因 cDNA 全序列的克隆及序列分析

本研究利用 RT-PCR 和 RACE 技术从大口黑鲈脑组织克隆得到大口黑鲈 NPY 基因 cDNA 核心片段, 5' 末端(图 1)及 3' 末端(图 2), 通过拼接得到 NPY 基因 cDNA 全序列。序列分析结果表明, 获得大口黑鲈 NPY 基因 cDNA 全序列长 664 bp(图 3), 其中 5' 端非翻译区(5'UTR)长 53 bp, 3' 端非翻译区(3'UTR)长 311 bp, 开放阅读框(ORF)长 300 bp, 编码 99 个氨基酸, 即前体 NPY。前体 NPY 包括三个部分, 28 个氨基酸组成的信号肽、36 个氨基酸组成的成熟 NPY 以及 32 个氨基酸组成的由 Gly-Lys-Arg 指示的 NPY C 端肽(C-terminal peptide of NPY CPON)。通过 NCBI BLAST 搜索得知, 所得大口黑

鲈 NPY基因 cDNA全序列与欧洲狼鲈、石斑鱼、牙鲆、鱚鱼 NPY核苷酸同源性很高, 均在 90%以上, 分

别为 93%、91%、92%、91%。成熟 NPY由 36个氨基酸残基组成, 含有 5个酪氨酸残基。

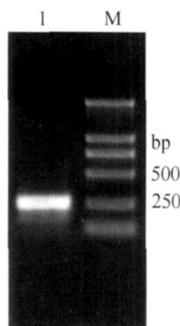


图 1 大口黑鲈 NPY 基因 5'RACE 扩增产物

Fig. 1 5'RACE-PCR product of largemouth bass NPY gene

M. Marker; 1. 5'RACE PCR 产物

M. Marker; 1. 5'RACE-PCR product

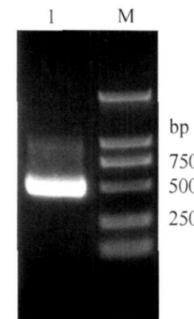


图 2 大口黑鲈 NPY 基因 3'RACE 扩增产物

Fig. 2 3'RACE-PCR product of largemouth bass NPY gene

M. Marker; 1. 3'RACE PCR 产物

M. Marker; 1. 3'RACE-PCR product

1	AGATATGACCCATCATGTGGTATGCTGTATCTTGACTCTCTGGAAAT	53
54	ATG CAT CCC AAC TTT GTG AGC TGG CTG GGG ACT CTG GGG TTC CTG CTT TGG GCG CTG	110
	M H P N F V S W L G T L G F L L W A L	
111	CTG TGC CTG GCC GCC CTA ACG GAG GGA TAC CCG GTG AT ACG GAG AAC CCC GGG GAG	167
	L C L G A L T E G Y P V K P E N P G E	
168	GAT GCT CGG GCG GAC GAG CTA GCC AAG TAC TAC TCA GCC CTG AGA CAC TAC ATC AAT	224
	D A P A D E L A K Y Y S A L R H Y I N	
225	CTC ATC ACA AGA CAG CGG TAT GGA AAG AGG TCT AGT CCT GAG ATT CTG GAC ACA CTG	281
	L I T R Q R Y [G K R] S S P E I L D T L	
282	GTC TCA GAG CTG CTG CTG AAG GAA ACC ACA GAC ACG CTT CCA CAG NCA AGA TAT GAC	338
	V S E L L L K E T T D T L P Q X R Y D	
339	CCA TCA TTG TGG TGA	353
	P S L W *	
354	TGCTGTCATCACTGTTGCTCACTCTGCTGCCGCCACCGCTGACATTCTGACCTGATCTCTTA	421
422	TGCTCATACCTAACATAATGACCAACCTGCTCTGCCCCCTTAACCTGTATGAGCCCCATATTCAA	489
490	CGCGCTCTAACATCATGAGTACACTCTGCTTATAGTATGTGCTCATAAAATTGTAATAGTTATT	557
558	CAGAGTTATGCTGGAACCTAAAGTAAAGTGAGGAGGGCATTTGATTTGATTTGATAATTGTT	625
626	GCTATTAAAGATTAAATTGTGCGAAAAAAA	664

图 3 大口黑鲈 NPY 基因 cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 3 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of largemouth bass prepro-NPY

核苷酸阴影区分别为起始密码子和终止密码子, 双下画线标识的 ATTAAT 是 poly A 尾的信号标志。

氨基酸序列单下画线标识的部分为成熟的 NPY, 方框内的 G K R 是指示 NPY C 端肽的标志

Initiation codon and termination codon are shaded. The putative signal for polyadenylation (ATTAAT) is doubly underlined. Deduced amino acid sequence of mature NPY is underlined. The signal of CPON (G K R) is boxed

2.2 NPY系统进化树的构建

NPY在进化中十分保守, 人、猴子、大鼠、小鼠以及家鸡 NPY氨基酸序列完全一致。我们克隆得到的大口黑鲈 NPY氨基酸核心片段与鱚鱼 NPY氨基酸核心片段也只相差一个氨基酸。为了更加准确地反映 NPY在进化中的变化, 我们通过 RACE法扩增得到了大口黑鲈 NPY基因全序列, 并将其前体氨基酸序列与其他 22 个物种 (鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、金鱼 (*Carassius auratus*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、沟鲶 (*Ictalurus punctatus*)、石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、欧洲狼鲈 (*Dicentrarchus labrax*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、鱚鱼 (*Siniperca chuatsi*)、人 (*Homo sapiens*)、猕猴 (*Macaca mulatta*)、牛 (*Bos taurus*)、羊 (*Ovis aries*)、小鼠 (*Mus musculus*)、大鼠 (*Rattus norvegicus*)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、泗盲游蛇 (*Typhlonectes natans*)、蝾螈 (*Ambystoma mexicanum*)、家鸡 (*Gallus gallus*)、南方河七鳃鳗 (*Idiomyzon gagei*)、海七鳃

鳗 (*Petromyzon marinus*)、欧洲河七鳃鳗 (*Lampetra fluviatilis*) 进行同源性比较, 以静水椎实螺 (*Lymnaea stagnalis*) 为外族群, 并通过 MEGA3 以 NJ 法 Poisson correction 模型建立 NPY 系统进化树 (图 4)。用作建树的 24 个物种分属于圆口纲、硬骨鱼纲、两栖纲、鸟纲、哺乳纲以及软体动物门肺螺亚纲 6 个大类群。在 NPY 系统进化树中, 24 个物种很好的聚集于各自所属的类群中。大口黑鲈位于硬骨鱼纲分支, 与其最近的两个分支是两栖纲、圆口纲分支; 但 NPY 系统进化树未能准确描述大类群分支内物种间的关系, 例如, 硬骨鱼纲分支中, 石斑鱼 (鲈形目)、大口黑鲈 (鲈形目)、欧洲狼鲈 (鲈形目) 与蝶形目的牙鲆聚在一起形成一个分支且支持率达 94%, 而鳜鱼 (鲈形目) 列入该分支的支持率却低于 50% 仅为 41%, 与传统分类学的观点相左。

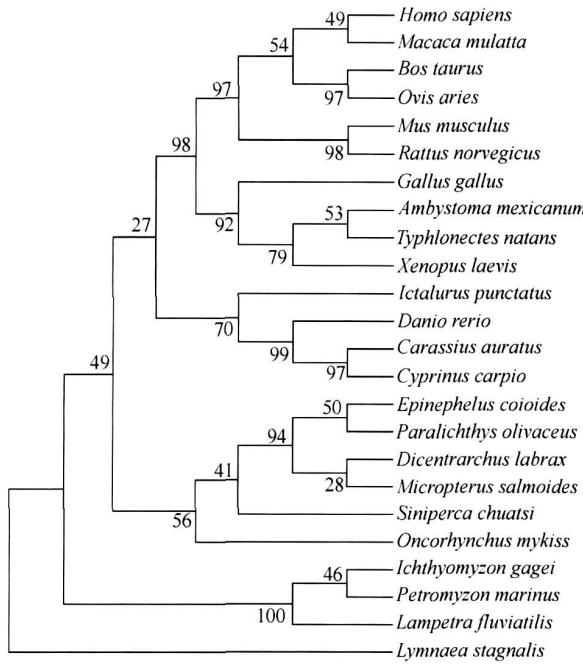


图 4 NPY 系统进化树

Fig 4 Phylogenetic tree of NPY gene

ClustalX 1.81 软件进行序列的对位排列 MEGA3 软件中的 NJ 法建树, 枝上数值表示 1000 次重复抽样所得的支持率
Phylogenetic tree of NPY gene obtained using MEGA3 software by NJ method. The value at the nodes presents the bootstrap value using 1000 bootstrap replications

2.3 大口黑鲈 UCP2 基因 cDNA 核心片段的克隆及序列分析

根据已知脊椎动物 UCP2 氨基酸保守区域设计简并引物 UCP201F、UCP202R 进行 RT-PCR 扩增,

得到与预期片段大小一致的 PCR 产物。将 RT-PCR 产物纯化、回收后克隆至 pMD 18-T 载体。用 M13 正向引物进行单向测序, 测序结果表明, 克隆得到的大口黑鲈 UCP2 基因 cDNA 核心片段长 737 bp。该 cDNA 序列包含一个开放阅读框架, 编码 245 个氨基酸 (图 5)。UCP2 特征结构 PVDVVKTR, 位于所得片段第 190 位到第 197 位。人 UCP1 第 146 位和第 148 位、苍鼠 UCP1 第 145 位和第 147 位氨基酸均为组氨酸, 这两个组氨酸被认为对于 UCP1 转运质子是必需的^[16], 而脊椎动物 UCP2 在这两个相应位置则均不是组氨酸, 这被认为是脊椎动物 UCP2 区别于 UCP1 的最重要结构特征, 例如, 鳜鱼 UCP2 在这两个相应位置上均是天门酰胺, 鳜鱼 UCP2 在这两个相应位置上分别是丝氨酸和甘氨酸 (本实验室未公布序列)。我们克隆的大口黑鲈 UCP2 在这两个相应位点上也不是组氨酸而分别是亮氨酸和甘氨酸 (大口黑鲈 UCP2 片段第 105 位和第 107 位)。

1	CAG AUT CAA GGA GAG AAC GCA GTG GAA ATC CGC TAC AAA GGG GTG TTT GGG ACA	60
Q	I Q G E K A V E G I R Y K G V F G T	
61	ATC AGC ACC ATG ATC CGG ACA GAG GGG CCC AGC TCT CTC TAC AAC GGG CTC GTA GCT GGG	120
I	S T M I R T E G P K S L Y N G L V A G	
121	CTG CAG AGA CAA GTG TGC TTT GGC TCT GTC AGA ATT GGC CTC TAC GAC AAC GTC AAA GAT	180
L	Q R Q V C F A S V R I G L Y D N V K D	
181	TTC TAC ACT GGT GGC AAA GAC AAC OCT GGT GTA GTG GAA CTC ATT CCT GCT GTC TCC ACT	240
F	F Y T G G K D N P G V V V R I I A G C T	
241	ACA GGC GCC ATG GCA GTG TCC TTT GCA CAA CCC ACT GAT GTG GTC AAG GTT GCA TTC CAA	300
T	G A M A V S F A Q P T D V V K V R F Q	
301	GCC CAG AGA CTC ATT GGT GTG GCC CGT CGC TAC AGT GGC AGC ATG CAG GGC TAT AAA	360
A	A Q W N [L] N [Q] V A R R Y S G T X Q A Y K	
361	CAC ATA TTT CAG GAT GAG GGC CTC TGT GCA TGT TGG AAA GGC ACA CTG CCC AAC ATC ACA	420
H	H I F Q N E G L R G L W K G T L P N I T	
421	AGA AAC GGG CTC ATT GTC AAC ATG ACA GAG CTC GTT GCA TAC TAC GAC GTG ATC AAC GAG GCA ATC	480
R	R N A L V N C T E L L V T Y D L I K E A I	
481	CTT CGA AAC AAA CTC ATG TCA GAC ATT TTG CCT TGC CAC ATT GTG TCT GGT TTT GGG GGC	540
L	L R H K L M S D N L P C H F V S A F G A	
541	GGT TTT GTT ACT ACT AA GGT ATT GCT TCC CCA GIA GAT GTG GTG AAA ACC AGA TAC ATG AAC	600
G	G F V T T V I A S [P] D V V V K T R Y M N	
601	TCA CCA CGA CGC TAG AAC AGC GCT ATT AAC TGC TCC TGC ACC ATG GTG ACT AAA GAG	660
S	S P P G Q Y K S A I N C S W T M L T K E	
661	GCG CCT CAG GCT TTC AAC AAA GGA TTC GTG CCC TCG TGT TTG AGG TTG TGG GGA TCG TGG AAC	720
G	G P T A F Y K G F V P V P S F L R L G S W N	
721	GTC GTG ATG TTT GTC AC	
V	V V M F V	

图 5 大口黑鲈 UCP2 基因 cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig 5 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of largemouth bass UCP2

氨基酸序列中阴影标识的部分 (L G) 是脊椎动物 UCP2 区别于 UCP1 的最重要结构特征, 方框内的区域 (PVDVVKTR) 是 UCP2 特征结构

The shaded areas of amino acid sequence are the most important differences between UCP2 and UCP1 in vertebrates. The sequence in the box (PVDVVKTR) is the motif of UCP2

2.4 UCP2 系统进化树的构建

将大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)、鳜鱼 (*Siniperca chuatsi*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、鳙鱼 (*Aristichthys nobilis*)、人 (*Homo sapiens*)、猕猴 (*Macaca mulatta*)、牛 (*Bos taurus*)、小鼠 (*Mus musculus*)、大鼠

(*Rattus norvegicus*) UCP2通过 MEGA3以 NJ法 Poisson correction模型建树, 以果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 氧戊二酸 萘果酸载体 (Oxoglutarate/malate carrier protein OMCP)为外族群(图 6)。UCP2系统进化树中大口黑鲈与鱲鱼聚在一起形成鲈形目分支; 斑马鱼、草鱼、鲤鱼、鳙鱼聚在一起形成鲤形目分支; 人、猕猴、牛、小鼠、大鼠聚在一起形成哺乳纲分支, 且鲤形目较鲈形目与哺乳纲更近, 这与基于形态学的鱼类系统发育研究结论相一致。鱼类系统发育研究认为, 鲤形目属于软鳍鱼类, 是较低等的真骨鱼类; 而鲈形目属于棘鳍鱼类, 是较高等的真骨鱼类, 鲤形目更为原始, 鲈形目更为特化, 鲤形目与哺乳动物关系更近。

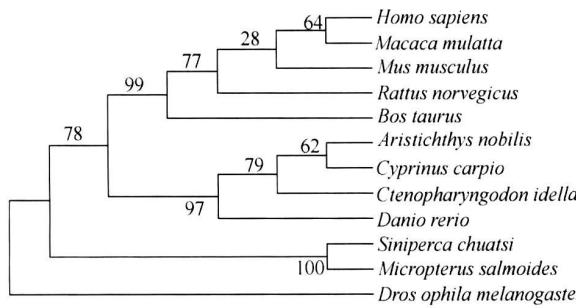


图 6 UCP2 系统进化树

Fig 6 Phylogenetic tree of UCP2 gene

ClustalX 1.81软件进行序列的对位排列, MEGA3软件中的 NJ法建树, 枝上数值表示 1000次重复抽样所得的支持率

Phylogenetic tree of UCP2 gene obtained using MEGA3 software by NJ method. The value at the nodes presents the bootstrap value using 1000 bootstrap replications

2.5 大口黑鲈 LPL 基因核心片段的克隆及序列分析

根据已知脊椎动物 LPL氨基酸保守区域设计简并引物 LPL01F, LPL02R, 进行 RT-PCR 扩增, 得到与预期片段大小一致的 PCR 产物。将 RT-PCR 产物纯化、回收后克隆至 pMD 18-T载体。用 M13正向引物进行单向测序, 测序结果表明, 克隆得到的大口黑鲈 LPL 基因 cDNA 核心片段长 509 bp。该 cDNA序列包含一个开放阅读框架, 编码 169个氨基酸(图 7)。斑马鱼完整 LPL由 511个氨基酸残基组成, 我们克隆的大口黑鲈 LPL核心片段相当于斑马鱼 LPL第 93位到第 261位的氨基酸片段。LPL以二聚体形式发挥功能, 2个单体通过疏水作用相结合, Ala²⁰³、Gly²¹⁵和 Gly²²²(人 LPL氨基酸残基位点编号)对二聚体形成十分重要, 在内温脊椎动物 LPL 中高度保守^[12], 这 3个氨基酸残基在大口黑鲈 LPL 中也存在: Ala¹³⁰、Gly¹⁴²和 Gly¹⁴⁹。

I	CC AAG ACC TTC ATA GTG ATC CAT GGC TGG ACG GTA ACA GGG ATG TTC GAA AGC AGC TGG GTG	59
K	T F I V I H G W T V T G M F E S W V	
60	CCC AAG TTG GTG TCT GCT TAT GAG CGC CAG CCC ACT GCC AAC ATT GTG ATC GTT GTG GAC	119
P	P K L V S A L Y E R E P S A N V I V D	
120	TGG CTG ACC CGC GGC AAC CAG CAC TAC CGG ACC TCC GCA GGC TAC ACT AAA CTA GTG GGA	179
W	W L T R A N Q H Y P T S A A Y T K L V G	
180	CGC GAC GTC GCC AAC TTT GTT ACT TGG CTA CAA AAC GAG CTC CAG TTG CCC TGG GAG AGG	239
R	R D V A K F V T W L Q N E L Q L P W E R	
240	ATT CAT CTG CTG GGT TAC AGT CTG GGA GCA CAT GTG GCT GGA ATC GCT GGA GGC CTC ACT	299
I	I H L L G Y S L G A H V A G I A G G L T	
300	GAC CAT AAA ATC AGC AGG ATC ACA GGT CTG GAT CCT GCT GGT CCC ACT ATT TGG GAG CAC GCA	359
D	D H K I S P L D P A G P T F E H A	
360	GAC AAC CAG GAC ACC CTG TCC AAA GAT GAC GGC CAG TTT GTG GAT GTC CTG CAC ACC AAC	419
D	D N Q D T L S K D D [A] Q F V D V L H T N	
420	AAC AGG GGC TCC CCA GAC CGC AGC ATT GGC ATC CAG AGA CCC GTG GGC CAC ATC GAC ATT	479
T	T R [C] S P D R S I [G] I Q R P V G H I D I	
480	TGG ACC AAC GGA GGC ACC TTC CAG CCA GGC	509
Y	Y P N G G T F Q P G	

图 7 大口黑鲈 LPL基因 cDNA核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig 7 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of largemouth bass LPL

氨基酸序列中阴影标识的部分 (A G G)是 LPL的高度保守区域, 对 LPL二聚体的形成十分重要

The shaded areas of amino acid sequence which are very important for LPL to form dimer are highly conserved

2.6 LPL 系统进化树的构建

将大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)、鱲鱼 (*Siniperca chuatsi*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、中华鲟 (*Acipenser sinensis*)、鳙鱼 (*Aristichthys nobilis*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、罗非鱼 (*Tilapia nilotica*)、人 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*)、大鼠 (*Rattus norvegicus*) LPL通过 MEGA3以 NJ法 Poisson correction模型建树, 以果蝇 (*Drosophila melanogaster*)胰脂肪酶 (Pancreatic lipase PL)为外族群(图 8)。LPL系统进化树中, 大口黑鲈、鱲鱼先聚在一起(支持率达 89%), 然后再跟罗非鱼聚在一起, 形成鲈形目分支。

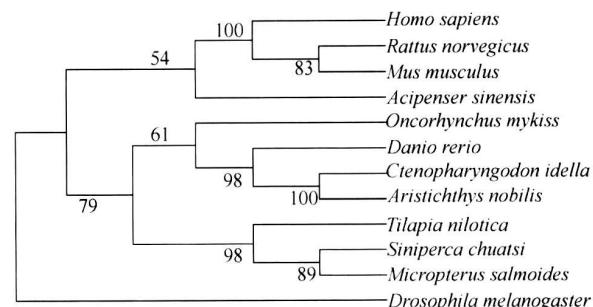


图 8 LPL系统进化树

Fig 8 Phylogenetic tree of LPL gene

ClustalX 1.81软件进行序列的对位排列, MEGA3软件中的 NJ法建树, 枝上数值表示 1000次重复抽样所得的支持率

Phylogenetic tree of LPL gene obtained using MEGA3 software by NJ method. The value at the nodes presents the bootstrap value using 1000 bootstrap replications

2.7 大口黑鲈 HL 基因 cDNA 核心片段的克隆及序列分析

根据已知脊椎动物 HL 氨基酸保守区域设计简并引物 HL01F、HL02R 进行 RT-PCR 扩增, 得到与预期片段大小一致的 PCR 产物。将 RT-PCR 产物电泳纯化、回收后克隆至 pMD 18-T 载体。用 M13 正向引物进行单向测序。测序结果表明, 克隆得到的大口黑鲈 HL 基因 cDNA 核心片段长 666 bp。该 cDNA 序列包含一个开放阅读框架, 编码 222 个氨基酸(图 9)。

```

1 GAT GCC AAG TTT GTG GAT GCC ATT CAT ACC TTC ACC CAT GAA CGT TTG GGC CTC AGT GTG 60
D A K F V D A I H T F T H E R L G L S V
61 GGC ATC AAG CAA GCT GTG GCA CAT TAT GAC TTT TAT CCC AAC GGA GGA GGC TTT CAA CCA 120
G I K Q A Y A H Y D F P Y P N G G D F Q P
121 GGA TGT GAC CTG CAA AGC ATT TAT GAC CAA GCG CAG TAT GGG CCT CTC GGT TTT GAG 180
G C D L Q S I Y E H I A Q Y G L L G F E
181 CAG ACA GTT AAA TGT GCT CAT GAG CGG TCC GTC GAT CTA TTC ATT GAC TCT GTC CTG AAT 240
Q T V K C A H E R S V H L F I D S V L N
241 AAA GAC AAC CAG AGC ATG GCC TAC AGG TGC AGT GAC AAA AAC GCT TTT GAC AAA GGC ATC 300
K D K Q S M A Y R C S D K N A F D K G I
301 TGT CTG GAC TGT CGG AAG AAC CGC TGC AAC ACA CTG GGC TAG GAT ATC AAC GAG AGG GTT CGC 360
C L D C R K N R C N T L G Y D I K R V R
361 AGT GGC ACC AGC AAG AGG CTC TAC CTG AAA ACA CGC TCT CGG ATG CCT TAC AAA CTC TAT 420
S G T S K R I Y L K T R S R M P Y K Y
421 CAT TAC CAG TTC AGG ATC CAG TTT GTC AAC CAG ATG GAG AGG ATC GAG CCC ACT CTC ACC 480
H Y Q F R I Q F V N Q M E R I E P T L T
481 ATT TCA CTC TCT GGA ACA AAG GAG GAG AGT GCC GAG CTC TCC ATC ACC ATC ACT GAA AGG 540
I S L S G T K E E S A E L S I T T I T E T
541 ATT TTG GGT AAT AAG ACC TTC ACC TTG ATC ACC CTG GAC AGA GAT TTA GGG GAT TTA 600
I L G N K T F T F L I T L D R D L G D L
601 ATG TTG CTC ACA ATG CGC TGG GAG GGA TCG GCT CTA TGG GCC AAT ATG TGG AAC ACA GTT 660
M L L T M R W E G S A L W A N M W N T V
661 AAG ACC 666
K T

```

图 9 大口黑鲈 HL 基因 cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig 9 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of largemouth bass HL

2.8 HL 系统进化树的构建

将大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)、鱥鱼 (*Siniperca chuatsi*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、中华鲟 (*Acipenser sinensis*)、鳙鱼 (*Aristichthys nobilis*)、罗非鱼 (*Tilapia nilotica*)、人 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*)、大鼠 (*Rattus norvegicus*) HL 通过 MEGA3 以 NJ 法 Poisson correction 模型建树, 以果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 脂肪酶 (Pancreatic lipase PL) 为外族群 (图 10)。HL 系统进化树中, 大口黑鲈、鱥鱼先聚在一起 (支持率达 97%), 然后再跟罗非鱼聚在一起, 构成鲈形目分支。

3 讨 论

NPY、UCP2、LPL、HL 四株系统进化树对物种间亲缘关系的描述并不完全一致, 这与 4 种蛋白质在功能上的差异及不同的分子进化速率有关。通过同

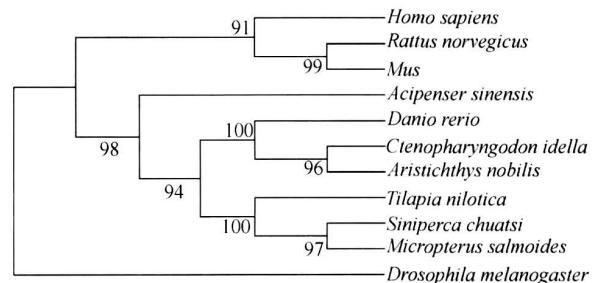


图 10 HL 系统进化树

Fig 10 Phylogenetic tree of HL gene

ClustalX 1.81 软件进行序列的对位排列, MEGA3 软件中的 NJ 法建树, 枝上数值表示 1000 次重复抽样所得的支持率

Phylogenetic tree of HL gene obtained using MEGA3 software by NJ method. The value at the nodes presents the bootstrap value using 1000 bootstrap replications

源性比较发现, 组织分布单一、功能简单、直接作用于靶分子的蛋白质, 其编码的基因序列变化大, 很不保守, 适于准确地反映近缘物种间的亲缘关系; 相反, 组织分布广泛、功能多样、作用机理复杂的蛋白, 其编码的基因非常保守, 适于准确反映远缘物种间的亲缘关系。在这四个基因中, NPY 广泛存在于无脊椎动物及所有脊椎动物体内, 是上游调控机制—中枢神经系统调控机制中一种重要的神经肽, 在进化中面对的选择压力很大, 非常保守, 因此适用于远缘物种即大类群间亲缘关系的研究。UCP2 是解偶联蛋白家族中的一员, 参与脂代谢的调节^[17~21], 控制活性氧的产生, 但 UCP2 的作用机理相对简单, 主要就是通过介导线粒体质子泄漏, 将质子驱动中贮存的能量以热能的形式释放, 最终减少 ATP 的生成, 属于下游的生理调控机制。与 NPY 基因相比, UCP2 基因在进化过程中面对的选择压力较小, 通过 UCP2 系统进化树研究亲缘关系较近物种的分子进化关系更加合理可靠。LPL 及 HL 同属于脂肪酶超家族, 都是由肝实质细胞分泌, 直接参与脂代谢过程。HL 与 LPL 在功能上有相似之处, 但其最适底物有所不同, 在进化中 LPL 与 HL 选择压力很小, 变异很大, 特别是 HL 较 LPL 变异更大, 适于进行亲缘关系很近物种的分子进化研究。综合以上的考虑, 虽然 NPY 系统进化树中大口黑鲈与鱥鱼亲缘关系较远 (大口黑鲈与欧洲狼鲈聚在一起形成一个分支, 然后与牙鲆和石斑鱼的分支聚在一起形成一个分支, 最后才与鱥鱼聚在一起), 但考虑到 NPY 系统进化树不适合描述近缘物种间的关系, 并且 UCP2、LPL、HL 系统进化树中大口黑鲈与鱥鱼都以较高的支持率形成一个分支, 因此我们推断大

口黑鲈与鱖鱼亲缘很近。虽然大口黑鲈原产美国而鱖鱼则是中国的主要淡水鱼类,但二者不但形态相似并且从分子生物学角度也可以找到两者近缘亲缘关系的证据。

参考文献:

- [1] Yang F. Animal nutrition (second edition). Beijing China Agriculture Press 2003 76—88 [杨凤. 动物营养学(第二版)]. 北京: 中国农业出版社. 2003 76—88]
- [2] Feng J Jia G. Studies on the fatty liver diseases resulted from different lipid levels in sciaenops ocellatus diets [J]. Acta Hydrobiologica Sinica 2005 29(1): 61—64 [冯健, 贾刚. 饲料中不同脂肪水平诱导红姑鱼脂肪肝病的研究. 水生生物学报, 2005 29(1): 61—64]
- [3] Feng J Qin Z B Effects of four dietary lipids on the performance of growth and body composition in pacific salmon on carhydruy [J]. Acta Hydrobiologica Sinica 2006 30(3): 256—261 [冯健, 覃志彪. 4种不同脂肪源对太平洋鲑生长和体组成的影响. 水生生物学报, 2006 30(3): 256—261]
- [4] Allen JM Adrian T E Tatemoto K et al Two novel related peptides neuropeptide Y (NPY) and peptide YY (PYY) inhibit the contraction of the electrically stimulated mouse vas deferens [J]. Neuropeptides 1982 3(2): 71—77
- [5] Hui A Neuropeptide Y feeding receptors are multiple subtypes involved [J]? Trend Pharmacol Sci 1999 20(2): 43—46
- [6] Lopez-Patino M A Guijano A I Isoma E et al Neuropeptide Y has a stimulatory action on feeding in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Eur J Pharmacol 1999 377: 147—153
- [7] Namaware Y K Peyon P R Lin X et al Regulation of food intake by neuropeptide Y (NPY) in goldfish [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2000 279(3): 1025—1034
- [8] Flory C Neverova M Collins S et al Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia [J]. Nat Genet 1997 15(3): 269—272
- [9] Zhou Y T Shimabukuro M Kojima K et al Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation [J]. Proc Natl Acad Sci USA 1997 94(12): 6386—6390
- [10] Auwerx J Leroy P Schoonjans K Lipoprotein lipase: recent contributions from molecular biology [J]. Crit Rev Clin Lab Sci 1992 29(3—4): 243—268
- [11] Zechner R The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism [J]. Curr Opin Lipidol 1997 8(2): 77—88
- [12] Kirchgessner T G Chuat JG Heinemann G et al Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family [J]. Proc Natl Acad Sci USA 1989 86 (24): 9647—9651
- [13] Dugi K A Vaishan B L Sakai N et al Adenovirus-mediated expression of hepatic lipase in LCAT transgenic mice [J]. Lipid Res 1997 38(9): 1822—1832
- [14] Marques Vidal P Azama C Collet X et al Hepatic lipase promotes the uptake of HDL esterified cholesterol by the perfused rat liver: a study using reconstituted HDL particles of defined phospholipid composition [J]. Lipid Res 1994 35(3): 373—384
- [15] Liao W Q Liang X F Wang L et al Molecular cloning and characterization of alpha-class glutathione S-transferase gene from the liver of silver carp, bighead carp and other major Chinese freshwater fishes [J]. Biochem Mol Toxicol 2006 20(3): 114—126
- [16] M Blennerhaber K S Echthay M Klingenberg H+ transport by uncoupling protein (UCP-1) is dependent on a histidine pair absent in UCP-2 and UCP-3 [J]. Biochemistry 1998 37: 3—8
- [17] Nagae I Yoshida T Saito M Up-regulation of uncoupling proteins by beta-adrenergic stimulation in L6 myotubes [J]. FEBS Lett 2001 494(3): 175—180
- [18] Boss O Hagen T Lowell B B Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism [J]. Diabetes 2000 49(2): 143—156
- [19] Li L X Skopen F Egeberg K Uncoupling protein-2 participates in cellular defense against oxidative stress in clonal beta-cells [J]. Biochem Biophys Res Commun 2001 282(1): 273—277
- [20] Klingenberg M Echthay K S Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view [J]. Biochim Biophys Acta 2001 1504(1): 128—143
- [21] Liang X F Lin X T Huang F et al The liver uncoupling protein 2 gene of the red sea bream (*Pagrus major*) with reference to its physiological function [J]. Acta Zoologica Sinica 2003 49(1): 110—117 [梁旭方, 林小涛, 黄芬, 尾形博. 真鲷肝脏解偶联蛋白 2 (UCP2) 基因及其功能的探讨. 动物学报, 2003 49(1): 110—117]

MOLECULAR CLONING AND EVOLUTATIONAL ANALYSIS OF NPY, UCP2, LPL AND HL GENE OF LARGEMOUTH BASS (*MICROPTERUS SALMOIDES*)

YU Yan LIANG Xu-Fang LI Shi-Ying and LIAO Wan-Qin

(Department of biotechnology Jinan University Guangzhou 510632)

Abstract Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) is a piscivorous teleost fish found only in the fresh waters of North America. It is a good game fish in the United States and a highly valued cultivated species in China. In order to study its lipid metabolism as well as its evolutional relationship with other percoids we used RT PCR method to get the partial cDNA sequences of NPY, UCP2, LPL and HL genes and deduced their corresponding amino acid sequences. Rapid amplification of the cDNA ends (RACE) PCR was used to amplify the 3' and 5' end of NPY cDNA. The complete NPY cDNA sequence of largemouth bass was 664 bp in length composed of an open reading frame (ORF) of 300 bp encoding a protein of 99 amino acid residues. A search of the BLAST neuropeptide database revealed that the deduced neuropeptide sequence of largemouth bass NPY was very similar to the NPY of other species such as European sea bass (*Dicentrarchus labrax* 93% identity), orange-spotted grouper (*Epinephelus coibensis* 91% identity), house mouse (*Mus musculus* 86% identity), and human (*Homo sapiens* 87% identity). The obtained UCP2 core sequence was 737 bp in length which contains an open reading frame coding 245 amino acids. The length of the obtained LPL core sequence was 509 bp coding 169 amino acids. The length of the obtained HL core sequence was 666 bp coding 222 amino acids. We made the amino acid sequence comparisons among the four obtained genes of largemouth bass and other species and got four phylogenetic trees by NJ method using software MEGA3. The phylogenetic tree built on the basis of conservative NPY gene showed a right relationship of fish with mollusk, amphibia, aves and mammals but it could not present accurate relationship of fish species. The phylogenetic tree built by less conservative UCP2 gene showed that largemouth bass and other percoids were farther away from mammals than the more primitive cyprinids. In order to make a further determination of the evolutional position of largemouth bass we used the least conservative genes (LPL and HL) of the four to build phylogenetic trees and found that largemouth bass was the closest to Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) which was distributed only in the fresh waters of East Asia. These results support the close relationship of largemouth bass and Chinese perch.

Key words Largemouth bass; NPY; UCP2; LPL; HL; Molecular cloning; Phylogenetic analysis