

瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachellii*)脂肪酸去饱和酶 FAD2 和延伸酶 ELOVL5 的克隆及表达分析*

覃川杰¹ 文正勇¹ 袁登越¹ 邵婷¹ 龚全²

(1. 内江师范学院生命科学学院 长江上游鱼类资源保护与利用四川省重点实验室 内江 641112;

2. 四川省农业科学院水产研究所 成都 611731)

摘要 脂肪酸去饱和酶(FAD, fatty acyl desaturase)及延伸酶(ELOVL, elongases of very long chain fatty acids)在鱼类脂肪代谢过程中发挥了重要作用。利用 RT-PCR 克隆得到瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachellii*)肝脏中控制高不饱和脂肪酸合成的(FAD2)和(ELOVL5)基因 cDNA 序列。瓦氏黄颡鱼 FAD2 cDNA 片段长 2041bp, 编码 447 个氨基酸, 含有 3 个组氨酸簇(HDxGH, HxxHH, QxxHH), 含亚铁血红素结合基序(HPGG)的类似细胞色素 b5 结构域等。瓦氏黄颡鱼 ELOVL5 cDNA 片段长 1065bp, 编码 294 个氨基酸, 含有组氨酸簇(HxxHH)、内质网停留信号(K、R)和 4 个 ELO 共有的保守区域(KxxExxDT, QxxFLHxYHH, NxxxHxxMYxYY, TxxQxxQ)等结构域。荧光定量 PCR 分析表明, FAD2 和 ELOVL5 mRNA 在瓦氏黄颡鱼脑、肝脏的表达量最高, 显著高于肠道、脾脏、肾脏、鳃等组织。结果表明, 瓦氏黄颡鱼具有合成高不饱和脂肪酸的关键酶 FAD2 和 ELOVL5, 且肝脏为合成高不饱和脂肪酸的主要场所。

关键词 脂肪酸去饱和酶(FAD2); 脂肪酸延伸酶(ELOVL5); 瓦氏黄颡鱼; cDNA

中图分类号 Q789 doi: 10.11693/hyhz20170400088

瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachellii*)是一种偏肉食性的杂食性鱼类, 隶属于鲶形目(Siluriformes)、鲶科(Bagride)、黄颡鱼属(*Pelteobagrus*), 其肉细嫩、味道鲜美, 深受消费市场青睐(丁瑞华, 1994)。该鱼体型较大、生长快, 已成为我国重要的淡水名优经济养殖鱼类。目前, 吴代武等(2017)发现, 饲料中添加过高的植物蛋白会明显降低黄颡鱼(*P. fulvidraco*)生长, 饲喂鱼蛋白水解物日粮使黄颡鱼肌肉游离氨基酸含量的升高, 特别是呈味氨基酸含量增加。饲料中添加豆油不会显著影响瓦氏黄颡鱼的增重率、肝体指数和体成分等, 但会影响肌肉中脂肪酸的组成, 增加肌肉中 C18:1n-9、C18:2n-6 和单不饱和脂肪酸比例(邵婷等, 2017)。变换昼夜投喂时间会显著影响肝脏中酰基-CoA 去饱和酶(acyl-CoA desaturase), 葡萄糖-6-磷酸酯酶(glucose-6-phosphatase), γ -谷氨酰转肽酶 1

(γ -glutamyltranspeptidase 1), 胰凝乳蛋白酶 B (chymotrypsin B)等与蛋白、脂肪和糖代谢的相关基因 mRNA 的表达(Qin *et al.*, 2017)。因此, 深入分析瓦氏黄颡鱼高不饱和脂肪酸的生物合成能力有助于制定合理的饲料配方。

鱼类必需营养素中的高度不饱和脂肪酸(high unsaturation fatty acids, HUFAs), 尤其是二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acids, DHA), 它们对维持生物机体的正常机能, 促进生长发育和繁殖, 以及提高成活率等方面起着重要生理作用。水产养殖业中大部分 HUFAs 的来源主要是鱼油, 但由于其高昂的价格, 增加了养殖成本, 导致经济效益降低; 因而, 缺乏高不饱和脂肪酸的豆油等植物油被广泛应用于水产饲料(覃川杰等, 2013)。一般而言, 鱼类可以通过 *n*-3 和

* 国家自然科学基金项目, 31402305 号; 四川省科技厅应用基础项目, 2017JY0161 号; 四川省“十三五”育种攻关项目, 2016NYZ0024 号。覃川杰, 博士, 副教授, E-mail: qinchuanjie@126.com

收稿日期: 2017-04-07, 收修改稿日期: 2017-04-25

/或 n-6 的途径去饱和及碳链的延长作用, 将植物产品中的 18:3 n-3 及 18:2 n-6 脂肪酸分别转化为长链高不饱和脂肪酸(Cook *et al.*, 2002)。但不同鱼类合成 HUFAs 的能力相差比较明显, 如淡水鱼类的高不饱和脂肪酸的合成能力明显优于海水鱼类(Tocher *et al.*, 1999, 2006)。因此, 了解和掌握养殖鱼类长链脂肪酸的合成能力, 有助于在鱼类养殖中合理利用不同的脂肪源。研究表明, 脂肪酸去饱和酶 $\Delta 6$ 和脂肪酸延伸酶 ELOVL5 在动物高效利用植物脂肪过程中发挥了关键作用(Xue *et al.*, 2014), 且脂肪酸去饱和酶和延长酶普遍存在于多数淡水鱼类中(Agaba *et al.*, 2005)。目前, 只从少数几种鱼类克隆了脂肪酸去饱和酶和延伸酶的 cDNA, 且主要集中在海水鱼类, 如军曹鱼 *Rachycentron canadum*, 大西洋鳕 *Gadus morhua* 等(许友卿等, 2010; Xue *et al.*, 2014); 赤鲈 *Perca fluviatilis* 和草鱼 *Ctenopharyngodon idellus* 等淡水鱼类中开展了相关研究(杜嵇华等, 2011; Geay *et al.*, 2016)。作者在本文中对瓦氏黄颡鱼的 FAD2 和 ELOVL5 cDNA 序列进行克隆, 并分析该两种基因在瓦氏黄颡鱼中的表达, 以期进一步探讨瓦氏黄颡鱼合成 HUFAs 的可能性及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料为鲜活瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachellii*) (体重约 15g/尾), 购于内江某养殖场。将实验鱼置于冰上麻醉, 然后处死, 同时将其肌肉、肝脏、心脏、脾脏、肠道、肾脏、鳃和脑取出, 液氮速冻, 置于 -80°C 保存备用。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

按照 RNAiso Plus (TaKaRa)试剂操作步骤提取瓦氏黄颡鱼肝脏总 RNA; 以肝脏总 RNA 为模板, oligo(dT)20 为逆转录引物, 按照 PrimeScriptTM RT reagent Kit (TaKaRa)逆转录试剂盒操作步骤合成 cDNA。

1.3 瓦氏黄颡鱼 FAD2 和 ELOVL5 基因 cDNA 克隆

根据人、猪以及鱼等物种的 FAD2 和 ELOVL5 基因保守区域, 设计 PCR 简并引物(上海生工合成)。以瓦氏黄颡鱼的肝脏 cDNA 为模板, 采用 rTaq DNA 聚合酶(TaKaRa), 以简并引物进行 PCR 扩增。用 Biometra PCR 仪扩增, PCR 反应参数为: 94 热启动 4min, 然后 94 变性 30s, 50 (FAD2)和 52 (ELOVL5)分别退火 30s, 再 72 延伸 1min, 30 个循环,

72 10min 终止反应。

将 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 将含有目的 DNA 片段的琼脂糖凝胶切下, 然后使用 Tiangene DNA 纯化试剂盒进行纯化。具体操作步骤按天根公司试剂盒的使用说明进行。

1.4 扩增片段的克隆与测序

将 PCR 产物经 2%的琼脂糖凝胶电泳纯化后, 再经 HQ & Q. Gel Extraction Kit II (U-gene)回收后, 将其克隆至 pMD 18-T 载体上(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, 由上海生工公司测序。

1.5 基因片段的序列分析

将测序后所得的瓦氏黄颡鱼 FAD2 和 ELOVL5 cDNA 片段序列, 在 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)进行同源比较。提交 NCBI 数据库后, 再根据所得到的 cDNA 序列, 推导其 FAD2 和 ELOVL5 氨基酸序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>); 再采用 Expert Protein Analysis System (<http://us.expasy.org/>)以及 ANTHEPROT 2000 V5.2 软件推导 cDNA 片段所得的 FAD2 和 ELOVL5 功能位点。

1.6 组织表达分析

按照 RNAiso Plus (TaKaRa)试剂操作步骤分别提取 9 尾瓦氏黄颡鱼肝脏、肌肉、肠道、心脏、脾脏、肾脏、鳃和脑总 RNA 后, 用 Prime ScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂合成 cDNA。根据已获得瓦氏黄颡鱼 FAD2 和 ELOVL5 cDNA 设计基因特异性引物分析组织表达, 特异性序列见表 1。以 β -actin 为内参基因(表 1)(Zheng *et al.*, 2010), 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 法(Livak *et al.*, 2001), 按照 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 试剂操作步骤和 Roche Light Cycler Nano (USA)荧光定量 PCR 仪分析检测 FAD2 和 ELOVL5 mRNA 相对表达量。

1.7 数据统计分析

采用平均值 \pm 标准差(Mean \pm S.D.)表示试验数据,

表 1 PCR 引物序列
Tab.1 The PCR primer sequences

引物名称	引物序列(5'—3')
FAD2-Qs	TTCAGAGCCCAGTCAA
FAD2-Qa	TTCAAAGGAGTGCC
ELOVL5-Qs	AGGGTTGGCTGTATTTC
ELOVL5-Qa	TGACTCGCACCGTTTG
β -actin-Qs	CACTGTGCCATCTACGAG
β -actin-Qa	CCATCTCTGCTCGAAGTC

采用 SPSS18.0 软件处理试验结果。基于单因方差分析基础上,采用 Duncan 多重比较法对组间差异进行检验,当 $P < 0.05$ 则为存在显著差异。

2 结果与讨论

动物体内可通过 n-6 和 n-3 途径合成 HUFAs。以 n-3 途径合成高不饱和脂肪酸,首先第一步反应是由 α -亚麻酸(α -linolenic acid, ALA, 18:3n-3)转化为十八碳四烯酸(octadecatetraenoic acid, OTA, 18:4n-3);而 n-6 途径则是由前体物质亚油酸(linoleic acid, LA, 18:2n-6)转化为 γ -亚麻酸(γ -linolenic acid, GLA, 18:3n-6);第一步转化的脱氢反应是 n-3 和 n-6 合成途径的限速步骤, $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶能将 α -亚麻酸和亚油酸分别转化成十八碳四烯酸和亚麻酸,是由亚油酸和亚麻酸合成高不饱和脂肪酸的限速酶(Tocher *et al.*, 2006)。如果动物体内缺乏 $\Delta 6$ 去饱和酶,或该酶活性受到抑制,就会妨碍机体内亚油酸向 γ -亚麻酸(n-6途径)和 α -亚麻酸向十八碳四烯酸(n-3途径)的转化,影响 HUFAs 的生物合成(Bell *et al.*, 2009)。然而,不同鱼类 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶的差异较大;在大西洋鲑(*Salmo salar*)等洄游鱼类体内发现两种 FAD 的存在,它们分别具有 $\Delta 5$ 和 $\Delta 6$ 的活性(Hastings *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2005),而斑马鱼(*Danio rerio*)FAD 则同时具有 $\Delta 5$ 和 $\Delta 6$ 活性(Hastings *et al.*, 2001)。本实验采用 RT-PCR 方法获得瓦氏黄颡鱼 FAD 基因的 cDNA 片段, FAD 基因 cDNA 序列片段 1904bp, 包括 86bp 的 5'-UTR、480bp 的 3'-UTR 和 1338bp 的 ORF(图 1)。ORF 分析获得 FAD 完整的 446 个氨基酸。经 BLASTp 比对分析发现,瓦氏黄颡鱼的 FAD2 氨基酸序列与其他物种的 FAD2 氨基酸序列有着高相似性(图 2)。瓦氏黄颡鱼 FAD2 氨基酸与虎头鲨 *Pangasianodon hypophthalmus* (88%, AFN21428.1)、黄颡鱼 *P. fulvidraco* (80%, AJQ20793.1)、墨西哥脂鲤 *Astyanax mexicanus* (76%, XP_007235183.1)、金钱鱼 *Scatophagus argus* (68%, AHA62794.1)等 FAD2 均有很高的同源性(表 2)。因此可以推断所克隆到的 cDNA 为 FAD2 基因片段,将所得该基因片段提交至 GenBank, 登录号分别为 KY853758。瓦氏黄颡鱼 FAD 氨基酸序列含有多个保守的结构域(图 2),与草鱼 *C. idellus*、刀鲚 *Coilia nasus*、军曹鱼 *R. canadum*、黄鳍 *Monopterus albus*、黄颡鱼 *P. fulvidraco* 等相似(杜嵇华等, 2011; 周秋白等, 2011; 魏广莲等, 2014; Song *et al.*, 2015), 含有八个保守的组氨酸残基, 构成三个保

守组氨酸富集区(histidine-richregion), 结构简式表示为 HX(3-4)H、HX(2-3)HH、(H/Q)X(2-3)HH (Zheng *et al.*, 2005), 3 个保守的组氨酸富集区和 1 个 Fe^{2+} 结合形成催化活性中心, 还包括亚铁血红素结合基序(HPGG)的类似细胞色素 b5 结构域等(Zheng *et al.*, 2009)。 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶是一种膜结合脂肪酸去饱和酶, 它以细胞色素 b5 氧化还原酶和 NADH 作为电子供体, 用来催化甘油酯中的脂肪酸脱氢(Sprecher *et al.*, 1995)。此外, NADH-细胞色素 b5 还原酶可以通过 FAD 中的细胞色素 b5 结构域直接向 FAD 蛋白催化位点传递电子, 催化甘油酯中的脂肪酸脱氢, 而不需要细胞色素 b5 蛋白参与(Guillou *et al.*, 2010)。前两个组氨酸簇位于 2 个跨膜区之间, 第三个组氨酸簇位于第二个跨膜区的后面, 这样三个保守的组氨酸簇与铁离子共同构成了 FAD 发挥催化活性的催化中心。2 个跨膜区对于它们的细胞定位和形成适合的空间结构十分重要(Los *et al.*, 1998)。

脂肪酸碳链的延伸主要发生于内质网(endoplasmic reticulum, ER)、过氧化物酶体(peroxisome)和线粒体(mitochondrion)中。在内质网上, 以脂酰 CoA (fatty acyl-CoA)作为起点, 通过缩合、还原、脱水、再还原四个步骤循环完成碳链的延伸, 合成超长链脂肪酸(very long chain fatty acid, VLCFA) (Leonard *et al.*, 2004)。超长链脂肪酸延伸酶(elongase of very long chain fatty acid, ELOVL)家族正是催化超长链脂肪酸合成循环反应中的第一个限速缩合步骤的酶类(Sprecher, 2000)。该家族的蛋白质序列中均含有 KxxExxD、HxxHH、HxxMYxYY、TxxQxxQ 等相似的结构域。哺乳动物体内 ELOVL 家族包含 7 个成员, 其中 ELOVL5 参与延长单不饱和脂肪酸(C16、C18)和多不饱和脂肪酸(C18、C20、C22)。它能调控肝脏脂肪及碳水化合物的代谢, 从而影响机体血脂、血糖浓度(Wang *et al.*, 2008)。目前鱼类中已经发现 ELOVL5, 并成为 HUFA 合成代谢研究热点。本实验, 采用 RT-PCR 克隆得到 ELOVL5 cDNA 片段 1164bp, 包括 70bp 的 5'-UTR、212bp 的 3'-UTR 和 882bp 的 ORF(图 3); ORF 编码 294 个氨基酸, BLASTp 比对分析表明, 该氨基酸序列与其他鱼类 ELOVL5 的氨基酸序列具有较高的相似性(图 4)。因此可以推断所克隆到的 cDNA 片段为瓦氏黄颡鱼 ELOVL5 基因, 将所得该基因片段提交至 GenBank, 登录号分别为 KY853759。瓦氏黄颡鱼 ELOVL5 氨基酸与拉氏巨鲶 *Pangasius larnaudii* (88%, AGR45586.1)、非

ACATCACTTATCACGCAGGA

CTGGCCACAGTTACATGAACACATCACGACTACGTGCAGACATACACGTTAAACCCTGACGAAGAG
 ATG GGT GGA GGT GGA CAT CGG GGT GAG CAG CTG GGG TCA GGA GAA AAT GGT ATA TGT GCT
 M G G G G H R G E Q L G S G E N G I C A
 CAG TAT ACC TGG GAG GAA GTG CAG AAA CAC ATT CGC AGG GGT GAT CAG TGG CTG GTG ATC
 Q Y T W E E V Q K H I R R G D Q W L V I
 GAG AGA AAA GTG TAC AAT GTG AGC GAG TGG ACA AAG AGA CAT CCT GGA GGA CGC AGA ATC
 E R K V Y N V S E W T K R H P G G R R I
 CTT GAG CAC TAT GCT GGC GAG GAT GCA ACG GAT GCG TTT GCA GCC TTC CAT CCG GAT CAG
 L E H Y A G E D A T D A F A A F H P D Q
 CGA TAC GTG AGG AAG TTC ATG AAG CCA CTG CTG CTG GGA GAG CTG ACA CCT TCA GAG CCC
 R Y V R K F M K P L L L G E L T P S E P
 AGT CAA GAC CAC GGC AAA AAT GCT GCT TTA ATG GAA GAT TTC CGG GAC TTG CGT AAG AGG
 S Q D H G K N A A L M E D F R D L R K R
 TTG GAA TCA CAG GGC TTG TTC CGC ACC AGTCCA CTC TTT TTT ATC CTA TAT CTT GGC CAC
 L E S Q G L F R T S P L F F I L Y L G H
 ATT CTG CTC TTG GAG GCC CTG TCT GTG GCA CTC CTT TGG AAT TTT GGC AAT GGC TGG ATA
 I L L L E A L S V A L L W N F G N G W I
 ATT TCA CTT CTA TTA TCT GTC TTG CTG GCC ACT TCA CAG GCT CAG GCT GGA TGG CTT CAG
 I S L L L S V L L A T S Q A Q A G W L Q
 CAT GAC TTT GGC CAC CTG TCA GTC TTT AAA AAT TCC ACT TGG GAT CAC TTA ATG CAC AAA
 H D F G H L S V F K N S T W D H L M H K
 TTT ATC ATT GGA CAC CTG AAG GGG GCT TCTCA AAT TGG TGG AAC CAT CGC CAC TTT CAG
 F I I G H L K G A S A N W W N H R H F Q
 CAC CAT GCT AAG CCC AAT ATT GTC AGT AAA GAC CCT GAC GTC AAC ATG TTG AAC ATA CTG
 H H A K P N I V S K D P D V N M L N I L
 GTC TTG GGA AAC ATC CTG CCT GTT GAG TAT GGG ATT AAA AAG GTG AAG CAC ATG CCA TAT
 V L G N I L P V E Y G I K K V K H M P Y
 AAC CAT CAG CAT CGG TAT TTC TTT TTG GTT GGC CCT CCC CTG CTC CTA CCA TTG TAC TTT
 N H Q H R Y F F L V G P P L L L P L Y F
 AAC CTG CAC GTT ATT CAG ACC ATG TAT TTG CAG CGG GAT TGG GTG GAT TTT GCA TGG TTT
 N L H V I Q T M Y L Q R D W V D F A W F
 TTG TCC TAC TAT GCA CGT TTC TTT ATG TTT TAT TCT CCG TAT TAT GGA ATT CTG GGA TCG
 L S Y Y A R F F M F Y S P Y Y G I L G S
 CTT GTG CTT ATA ACT TTT GTA AGG TTT CTG GAG AGT CAT TGG TTT GTG TGG GTG ACC CAG
 L V L I T F V R F L E S H W F V W V T Q
 ATG AAT CAC ATT CCC ATG GAC ATT GAC CAT GAT AAA CAT GAC GAT TGG CTC AGC ATG CAG
 M N H I P M D I D H D K H D D W L S M Q
 TTG AAA GCT ACT TGT AAT ATT GAG CAT TCA CAG TTC AAT GAT TGG TTC AGC GGC CAT CTC
 L K A T C N I E H S Q F N D W F S G H L
 AAC TTC CAG ATC GAG CAC CAT CTA TTC CCC ATG ATG CCT CGC CAT AAC TAT AGC CGT GCG
 N F Q I E H H L F P M M P R H N Y S R A
 TCT CCT CAA GTA CGA GAA CTC TGT GAG AAG TAT GGA ATT CAG TAC CAG GTC AAA GGC CTG
 S P Q V R E L C E K Y G I Q Y Q V K G L
 TGG GAA TCC TGG TGT GAC ATT GTC AGG TCT TTG AAG AAA TCT GGT GAG CTG TGG CTA GAT
 W E S W C D I V R S L K K S G E L W L D
 GCC TAC CTC CAC AAA TAATCATCTTACCTGTTGTTTAAAATGACATCTACAGTGAATAATCTTAA
 A Y L H K *
 AAAACATCTACATTTCAACTATATACACAGTAGTGACAATAATAGGACTTTAATTTGATTTTAGTAGTATG
 TATTGTAAGCCTTTTTGCCTTTGAATTTAGATTTTAATCTTCTCATGATCCATGTCCTGTATGCTGGAAC
 AATGTATTATTTGTTAATGAATTTGGGACGACAAGCCTCTCTCCAAAAACAACATTTATAATACCTTTTCA
 TGCTCATGTTAATCATCAGTATTAAAATTATAGTCTGGACCTCTAGATTCAAATGTTATAATAGTTTCTTA
 TATTATAATAATTTCTAATAACATCTTTTCTTGAACAGTTTTTAAATAGCACTTAATCATAGTAAA

图 1 瓦氏黄颡鱼 FAD2 基因 cDNA 序列及编码的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequences of FAD2 cDNA and deduced amino acid sequence of *P. vachellii*

注: 双下划、下划虚线、双下划线、下划线分别表示类似细胞色素 b5 结构、跨膜结构、组氨酸簇、含亚铁的血红素结合基序

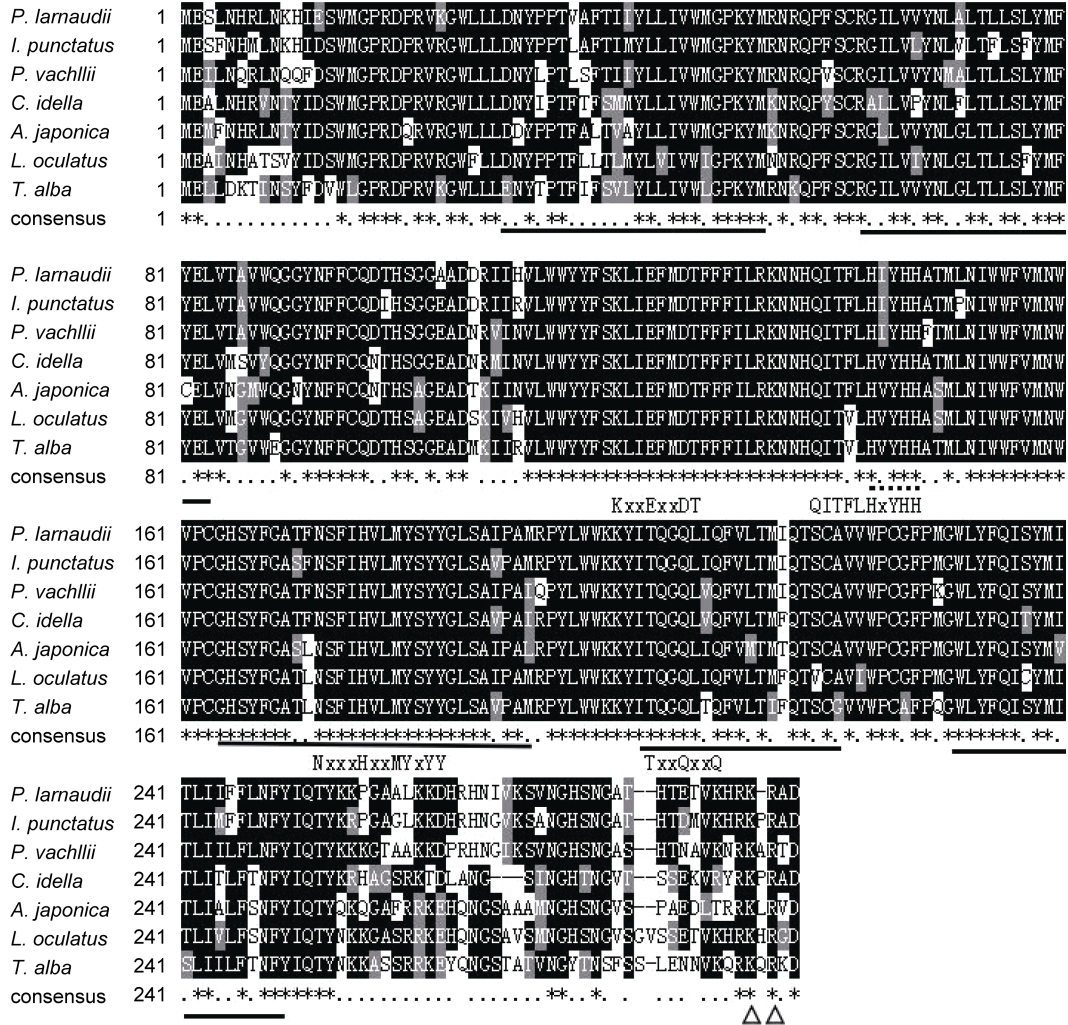


图2 瓦氏黄颡鱼 FAD2 基因氨基酸序列与其他物种 FADS2 基因的氨基酸序列多重比较

Fig.2 Alignment of FAD2 of *P. vachllii* with other homologues using Clustal W program

注：阴影部分表示完全相同序列，灰色部分表示相对保守但不完全相同的序列。下划线表示细胞色素 b5 结构域，双下划线表示氨基酸簇，虚线表示跨膜区，双虚线表示亚铁血红素结合基序。△表示内质网停留信号

表2 物种名称、序列号和相似性

Tab.2 Accession number, scientific name and identity of the members of FAD2 and ELOVL5 amino sequences

基因序列	拉丁物种名	中文名	基因	相似性
AAL17639.1	<i>Sparus aurata</i>	金头鲷	FAD2	68%
ACD10793.1	<i>Dicentrarchus labrax</i>	欧洲舌齿鲈	FAD2	68%
AEQ92868.1	<i>Solea senegalensis</i>	塞内加尔鲷	FAD2	67%
ABV01368.2	<i>Labeo rohita</i>	露斯塔野鲮	FAD2	69%
AAS49163.1	<i>Scophthalmus maximus</i>	大菱鲆	FAD2	67%
AGR45586.1	<i>Pangasius larnaudii</i>	拉氏巨鲶	ELOVL5	88%
NP_001188041.1	<i>Ictalurus punctatus</i>	斑点叉尾鲷	ELOVL5	86%
ADU04500.1	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	草鱼	ELOVL5	81%
XP_009961335.1	<i>Tyto alba</i>	仓鸮	ELOVL5	77%
XP_015714733.1	<i>Coturnix japonica</i>	鹌鹑	ELOVL5	76%
XP_006638754.1	<i>Lepisosteus oculatus</i>	斑点雀鲷	ELOVL5	76%

TCAAAC

ACACACACACACTATCTCAGACTGAAACAGCAGAAGCAGGGACCCAAGGACGGAGGCTAGAA
 ATG GAA ATC TTG AAC CAG AGG CTC AAC CAA CAG TTT GAC TCA TGG ATG GGT CCG AGG GAT
 M E I L N Q R L N Q Q F D S W M G P R D
 CCT CGT GTG AGA GGC TGG CTC CTG CTG GAC AAC TAC CTA CCC ACT CTG TCC TTC ACC ATC
 P R V R G W L L L D N Y L P T L S F T I
 ATT TAC CTC CTG ATC GTG TGG ATG GGG CCA AAG TAC ATG AGG AAC AGG CAG CCT GTC TCC
 I Y L L I V W M G P K Y M R N R Q P V S
 TGC AGG GGG ATC TTA GTG GTG TAC AAT ATG GCG CTC ACC CTT CTC TCC CTT TAC ATG TTT
 C R G I L V V Y N M A L T L L S L Y M F
 TAT GAG CTT GTG ACT GCT GTG TGG CAA GGC GGC TAT AAT TTC TTT TGC CAA GAC ACT CAC
 Y E L V T A V W Q G G Y N F F C Q D T H
 AGC GGA GGA GAG GCC GAC AAC AGG GTT ATAAAC GTG CTG TGG TGG TAC TAC TTC TCC AAG
 S G G E A D N R V I N V L W W Y Y F S K
 CTC ATC GAG TTT ATG GAT ACC TTC TTC ATC CTG CGC AAA AAC AAC CAC CAG ATC ACC
 L I E F M D T F F F I L R K N N H Q I T
 TTC CTG CAC ATC TAC CAC CAT TTC ACA ATG CTG AAC ATC TGG TGG TTC GTC ATG AAC TGG
 F L H I Y H H F T M L N I W W F V M N W
 GTG CCA TGT GGA CAC TCC TAT TTT GGT GCC ACC TTT AAC AGC TTC ATC CAT GTG CTA ATG
 V P C G H S Y F G A T F N S F I H V L M
 TAT TCT TAC TAC GGG CTC TCA GCT ATT CCT GCC ATT CAG CCG TAC CTG TGG TGG AAG AAG
 Y S Y Y G L S A I P A I Q P Y L W W K K
 TAT ATA ACC CAA GGA CAG CTG GTC CAG TTTGTC CTG ACT ATG ATC CAG ACA TCC TGC GCT
 Y I T Q G Q L V Q F V L T M I Q T S C A
 GTG GTG TGG CCC TGC GGT TTC CCA AAG GGTGG CTG TAT TTC CAG ATC AGT TAT ATG ATC
 V V W P C G F P K G W L Y F Q I S Y M I
 ACC CTT ATT ATT CTC TTC TTA AAC TTC TAC ATA CAG ACT TAT AAG AAG AAG GGC ACT GCA
 T L I I L F L N F Y I Q T Y K K K G T A
 GCA AAA AAG GAT CCC CGG CAC AAC GGC ATT AAA TCT GTG AAC GGC CAC TCA AAC GGT GCG
 A K K D P R H N G I K S V N G H S N G A
 AGT CAT ACA AAT GCT GTA AAG AAC AGG AAA GCG AGA ACA GAC TGA GGACCGGTCTATTTCGT
 S H T N A V K N R K A R T D *
 CCAGTTCACCATATGTGTAATCTTTCTGTGACCGTGTACCCAGGCTACACACAGCAGAGCAAGAA
 GCTAAATCAAATATATCTATTTTACTGTTGATGAGAGTCATAAAATTTTGACACTTTTGTGTCTACTA
 TTGTTTCATATTGAATCAAAAGACAATATGAGGAAAATTACACTGAAATTAATA

图 3 瓦氏黄颡鱼 ELOVL5 基因 cDNA 序列及编码的氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide sequences of ELOVL5 cDNA and deduced amino acid sequence of *P. vachellii*
 注: 方框、下划虚、下划线和阴影分别表示组氨酸簇、跨膜结构、4 个 ELO 共有的保守区域及内质网停留信号

洲鲶(*C. gariepinus*, 86%, AAT81405.1)、草鱼(*C. idella*, 81%, ADU04500.1)、墨西哥丽脂鲤(*A. mexicanus*, 78%, XP_007240116.1)等均有很高的同源性(表 2)。瓦氏黄颡鱼 ELOVL5 基因含有内质网停留信号(K, R)、高度保守的氧化还原中心组氨酸簇(HxxHH, 位于第 2 个跨膜区内)以及跨膜区(QxxFLHxYHH, KxxExxD, TxxQxxQ, NxxxHxxNYxYY)等结构功能域(图 4)。同样, 黄颡鱼 *P. fulvidraco*、草鱼 *C. idella*、黄鳝 *M. albus* 等鱼类 ELOVL5 基因均含有组氨酸簇、碳末端内质

网停留信号、多个跨膜区域等, 且在不同鱼类中高度保守(杜嵇华等, 2011; 周秋白等, 2011; Song *et al.*, 2015), 以上这些结构域对形成合适构型和其细胞定位有着重要的作用(Los *et al.*, 1998)。

脂肪酸去饱和酶基因在瓦氏黄颡鱼的 8 种组织中均有表达。在肝脏和脑部的表达量最高, 其次为心、肠道、肾、脾、鳃, 而在皮肤和肌肉的表达量相对较低, 见图 5。类似地, 刀鲚 FAD6 在脑、肠道、肌肉、肝脏、肾脏、心、鳃等组织中具有表达, 且刀

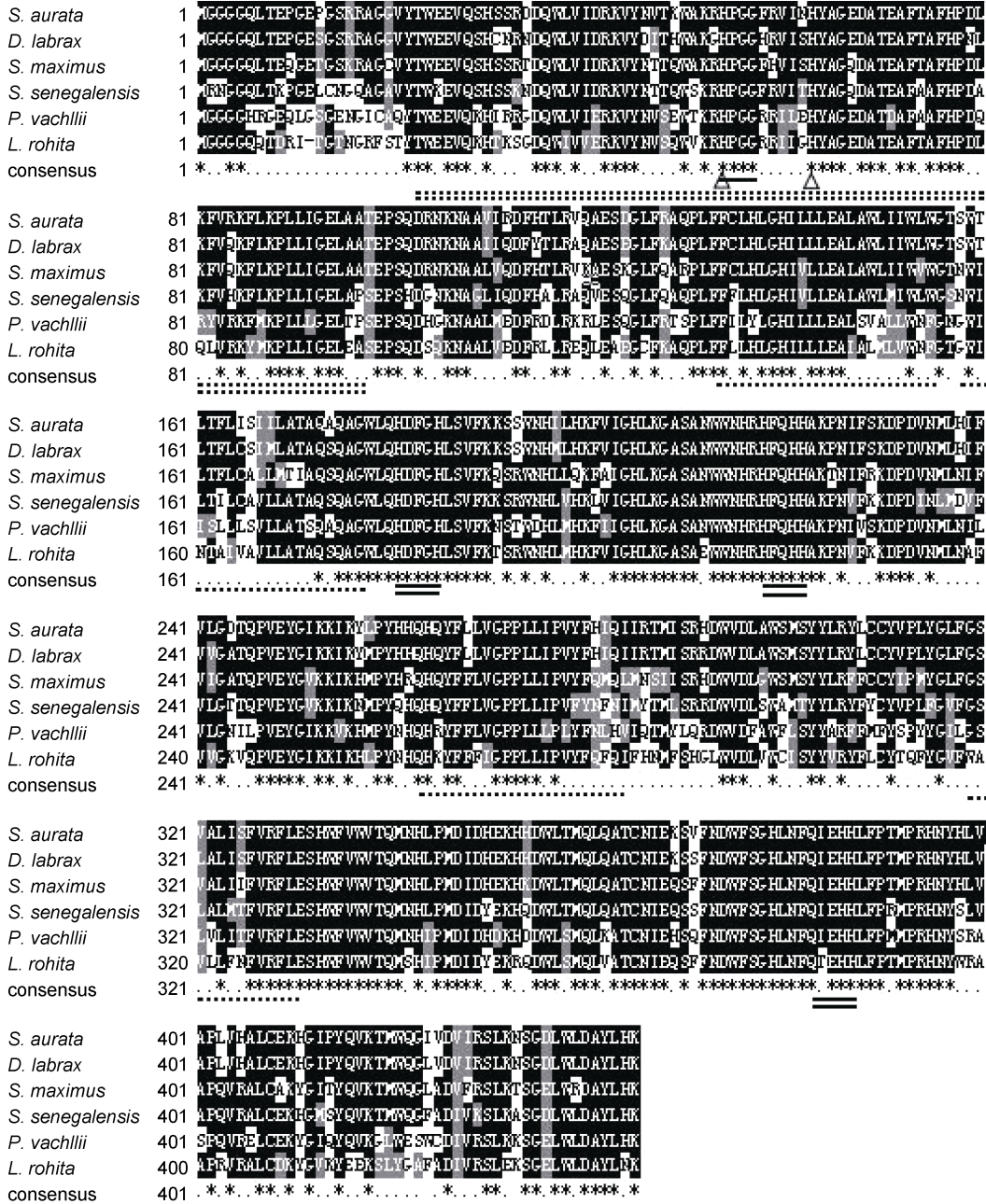


图4 瓦氏黄颡鱼 ELOVL5 基因氨基酸序列与其他物种 ELOVL5 基因的氨基酸序列多重比较

Fig.4 Alignment of ELOVL5 of *P. vachllii* with other homologues using Clustal W program

注: 阴影部分表示完全相同序列, 灰色部分表示相对保守但不完全相同的序列。下划虚线表示组氨酸簇, Δ表示内质网停留信号, 下划线表示跨膜区

鲚 FAD6 基因在脑中的表达量最高, 并且极显著地高于其他组织($P < 0.01$), 其次是肠道(魏广莲等, 2014)。非洲鲶 *C. gariepinus* 和赤鲈 *Perca fluviatilis* 的 FAD2 在肝脏和脑中的表达量也显著高于肠道、脾脏、肾脏等组织(Geay et al, 2016; Oboh et al, 2016)。黄颡鱼 *P. fulvidraco* FAD2 mRNA 在肝脏和脑的表达水平显著高于肌肉、脾脏和鳃组织, 但显著低于肠道(Song et al,

2015)。类似地, 大西洋鳕 *Gadus morhua* Δ6 去饱和酶基因在脑中的表达量最高, 其次是肝、肾和肠(Tocher et al, 2006)。虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* 的 Δ6 FAD2 基因在肝脏、脑、肠道等组织中有着较高的表达量(Seiliez et al, 2003)。有研究表明, 在幼鱼生长发育的关键阶段, 鱼体的神经组织特别在脑和视网膜中含有高浓度的 DHA, 并且 DHA 和 n-3 HUFA 的总含量

高于其他非神经组织中的含量(Tocher *et al*, 2006)。FAD2 在多种鱼类的脑中均显著高于肠道、肝脏等营养代谢器官, 究其原因, 可能是脑中需要合成或摄取较多的高不饱和脂肪酸, 用以维持其正常的代谢功能的缘故(Naughton, 1981)。

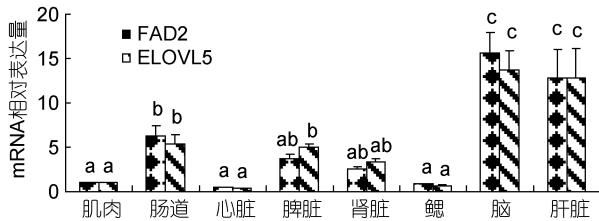


图5 FAD2 和 ELOVL5 mRNA 在瓦氏黄颡鱼组织中的相对表达量

Fig.5 Distribution of FAD2 and ELOVL5 mRNA in tissues of *P. vachellii*

脂肪酸延伸酶基因 ELOVL5 在瓦氏黄颡鱼的 8 种组织中也均有表达, 其中 ELOVL5 mRNA 在瓦氏黄颡鱼脑和肝脏中的表达量最高, 其次是垂体和肠道, 肌肉和血液中的表达水平较低(图 5)。类似地, ELOVL5 在非洲鲶 *C. gariepinus* 和大西洋鳕 *G. morhua* 的组织中均有表达(Xue *et al*, 2014; Oboh *et al*, 2016)。ELOVL5 mRNA 在大西洋鳕的脑和鳃组织中的表达水平要高于肌肉、血液、肝脏和心脏; 而 ELOVL5a 和 ELOVL5b mRNA 在大西洋鳕中肠道(幽门盲囊), 肝脏和脑的表达水平最高。类似于其他多种淡水鱼类, FAD2 和 ELOVL2 mRNAs 的组织表达水平表明, 肝脏是鱼类长链多不饱和脂肪酸生物合成的主要场所(Morais *et al*, 2009)。

3 结论

本实验成功克隆了瓦氏黄颡鱼 ELOVL5 和 FAD2 基因 cDNA 序列, 瓦氏黄颡鱼 ELOVL5 和 FAD2 氨基酸序列与其它鱼类 ELOVL5 和 FAD2 的氨基酸序列具有较高的相似性, 且含有高度保守的结构域。FAD2 和 ELOVL5 mRNA 在瓦氏黄颡鱼脑、肝脏的表达量显著高于肠道、脾脏、肾脏、鳃等组织。结果表明, 瓦氏黄颡鱼具有合成高不饱和脂肪酸的关键酶 FAD2 和 ELOVL5, 且肝脏可能为合成高不饱和脂肪酸的主要场所。

参 考 文 献

丁瑞华, 1994. 四川鱼类志. 成都: 四川科学技术出版社, 451
许友卿, 郑一民, 丁兆坤, 2010. 军曹鱼 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶的

- cDNA 序列克隆与基因表达. 中国水产科学, 17(6): 1183—1191
- 杜穗华, 梁旭方, 程佳齐等, 2011. 草鱼脂肪酸去饱和酶和延长酶基因 cDNA 全序列的克隆与分析. 暨南大学学报(自然科学版), 32(5): 513—520
- 吴代武, 何杰, 叶元士等, 2017. 日粮中鱼蛋白水解物对黄颡鱼生长、体成分和血清生理指标的影响. 水产学报, 41(3): 415—427
- 邵婷, 覃川杰, 袁登越等, 2017. 再投喂鱼油对瓦氏黄颡鱼肌肉脂肪酸组成的影响. 水生生物学报, 41(1): 139—145
- 周秋白, 朱长生, 郑宇等, 2011. 黄颡鱼脂肪酸去饱和酶及延长酶基因 cDNA 的克隆与表达. 江西农业大学学报, 34(1): 134—140
- 覃川杰, 颌江, 王永明等, 2013. 植物油替代鱼油影响鱼类脂肪代谢的研究进展. 海洋湖沼通报, (4): 89—100
- 魏广莲, 徐钢春, 顾若波等, 2014. 刀鲚 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶 cDNA 的克隆与组织表达检测. 南京农业大学学报, 37(3): 138—144
- Agaba M K, Tocher D R, Zheng X Z *et al*, 2005. Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases of marine and freshwater teleost fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 142(3): 342—352
- Bell M V, Tocher D R, 2009. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. In: Kainz M, Brett M T, Arts M T eds. Lipids in Aquatic Ecosystems. New York: Springer, 211—236
- Cook H W, McMaster C R, 2002. Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. In: Vance D E, Vance J E. New Comprehensive Biochemistry Volume 36: Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 181—204
- Geay F, Tinti E, Mellery J *et al*, 2016. Cloning and functional characterization of $\Delta 6$ fatty acid desaturase (FADS2) in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 191: 112—125
- Guillou H, Zadravec D, Martin P G P *et al*, 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. Progress in Lipid Research, 49(2): 186—199
- Hastings N, Agaba M, Tocher D R *et al*, 2001. A vertebrate fatty acid desaturase with $\Delta 5$ and $\Delta 6$ activities. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(25): 14304—14309
- Hastings N, Agaba M K, Tocher D R *et al*, 2005. Molecular cloning and functional characterization of fatty acyl desaturase and elongase cDNAs involved in the production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from α -linolenic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Mar Biotechnol, 6: 463—474
- Leonard A E, Pereira S L, Sprecher H *et al*, 2004. Elongation of long-chain fatty acids. Progress in Lipid Research, 43(1): 36—54
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene

- expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Los D A, Muratan N, 1998. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1394(1): 3—15
- Morais S, Monroig O, Zheng X Z *et al*, 2009. Highly unsaturated fatty acid synthesis in Atlantic salmon: characterization of ELOVL5- and ELOVL2-like elongases. *Marine Biotechnology*, 11(5): 627—639
- Naughton J M, 1981. Supply of polyenoic fatty acids to the mammalian brain: the ease of conversion of the short-chain essential fatty acids to their longer chain polyunsaturated metabolites in liver, brain, placenta and blood. *International Journal of Biochemistry*, 13(1): 21—32
- Oboh A, Betancor M B, Tocher D R *et al*, 2016. Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in the African catfish *Clarias gariepinus*: Molecular cloning and functional characterisation of fatty acyl desaturase (*fads2*) and elongase (*elovl2*) cDNAs. *Aquaculture*, 462: 70—79
- Qin C J, Gong Q, Wen Z Y *et al*, 2017. Comparative analysis of the liver transcriptome of *Pelteobagrus vachellii* with an alternative feeding time. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 22: 131—138
- Seilliez I, Panserat S, Corraze G *et al*, 2003. Cloning and nutritional regulation of a $\Delta 6$ -desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 135(3): 449—460
- Song Y F, Luo Z, Pan Y X *et al*, 2015. Three unsaturated fatty acid biosynthesis-related genes in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*: Molecular characterization, tissue expression and transcriptional regulation by leptin. *Gene*, 563(1): 1—9
- Sprecher H, Luthria D L, Mohammed B S *et al*, 1995. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Lipid Research*, 36(12): 2471—2477
- Sprecher H, 2000. Metabolism of highly unsaturated *n*-3 and *n*-6 fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1486(2): 219—231
- Tocher D R, Ghioni C, 1999. Fatty acid metabolism in marine fish: Low activity of fatty acyl $\Delta 5$ desaturation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cells. *Lipids*, 34(5): 433—434
- Tocher D R, Zheng X Z, Schlechtriem C *et al*, 2006. Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl $\Delta 6$ desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids*, 41(11): 1003—1016
- Wang Y, Torres-Gonzalez M, Tripathy S *et al*, 2008. Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity affects multiple pathways controlling hepatic lipid and carbohydrate composition. *Journal of Lipid Research*, 49(7): 1538—1552
- Xue X, Feng C Y, Hixson S M *et al*, 2014. Rise Characterization of the fatty acyl elongase (*elovl*) gene family, and hepatic *elovl* and $\Delta 6$ fatty acyl desaturase transcript expression and fatty acid responses to diets containing camelina oil in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 175: 9—22
- Zheng X Z, Ding Z K, Xu Y Q *et al*, 2009. Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: Characterisation of cDNAs of fatty acyl $\Delta 6$ desaturase and *elovl5* elongase of cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 290(1—2): 122—131
- Zheng X Z, Tocher D R, Dickson C A *et al*, 2005. Highly unsaturated fatty acid synthesis in vertebrates: new insights with the cloning and characterization of a $\Delta 6$ desaturase of Atlantic salmon. *Lipids*, 40(1): 13—24
- Zheng K K, Zhu X M, Han D *et al*, 2010. Effects of dietary lipid levels on growth, survival and lipid metabolism during early ontogeny of *Pelteobagrus vachelli* larvae. *Aquaculture*, 299(1—4): 121—127

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF FATTY ACID DESATURASE AND ELONGASE GENES IN DARKBARBEL CATFISH *PELTEOBAGRUS VACHELLII*

QIN Chuan-Jie¹, WEN Zheng-Yong¹, YUAN Deng-Yue¹, SHAO Ting¹, GONG Quan²

(1. Key Laboratory of Sichuan Province for Fishes Conservation and Utilization in the Upper Reaches of the Yangtze River, Neijiang Normal University, Neijiang 641112, China; 2. Fisheries Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 611731, China)

Abstract Understanding the endogenous synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids is of benefit to fish feed formulation. A FADS2 and an ELOVL5 cDNA were cloned containing open reading frames (ORF) of 1338 base pair (bp) and 864 bp specifying proteins of 447 and 294 amino acids, respectively. The deduced amino acid sequence of *Pelteobagrus vachellii* FADS2 possessed conserved motif and included the histidine boxes, cytochrome b5 domain, transmembrane regions, and ELOVL 5 containing histidine boxes, endoplasmic reticulum retention signal domain, and transmembrane regions. In addition, FADS2 and ELOVL 5 mRNA distributed mainly in the brain and liver, and expressed significantly higher than that of intestine, spleen, kidney, gill, heart and muscle. These results indicate that *P. vachellii* possessed the desaturase and elongase, and the liver was the main tissues for synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids.

Key words fatty acid desaturase; fatty acid elongase; *Pelteobagrus vachellii*; cDNA