

周杰,俞菊华,李红霞,等. 鲤鱼2种脂蛋白脂肪酶基因的cDNA克隆、表达及其酶活性[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2):414-423.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.02.027

## 鲤鱼2种脂蛋白脂肪酶基因的cDNA克隆、表达及其酶活性

周杰<sup>1</sup>, 俞菊华<sup>1,2</sup>, 李红霞<sup>2</sup>, 李建林<sup>2</sup>, 唐永凯<sup>2</sup>, 于凡<sup>2</sup>

(1.南京农业大学无锡渔业学院,江苏无锡214081; 2.中国水产科学研究院淡水渔业研究中心农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室,江苏无锡214081)

**摘要:** 为了对鲤鱼(*Cyprinus carpio*)2种脂蛋白脂肪酶(*LPL1*、*LPL2*)基因进行cDNA克隆以及表达和酶活性分析,测定了鲤鱼2种脂蛋白脂肪酶基因的组织表达特征,对这2种基因进行了原核表达,采用对硝基苯酚法比较了2种*LPL*的酶活性。克隆结果表明,鲤鱼*LPL1*和*LPL2*基因的开放阅读框分别为1524bp和1503bp,分别编码507个和500个氨基酸,氨基酸相似性为45.51%,*LPL2*氨基酸功能位点由<sup>83</sup>N突变至<sup>83</sup>K。实时荧光定量PCR结果表明:*LPL1*和*LPL2*均在肝脏中表达量最高,其次在心脏、脂肪、肌肉、脑、肾中,前肠表达量最低,在所有组织(器官)中*LPL1*的表达量比*LPL2*高。构建的原核表达载体*LPLs*-pEASY(E2),经IPTG诱导,在Transetta(DE3)细胞中表达了分子量分别为 $5.55 \times 10^4$ 、 $5.35 \times 10^4$ 的融合蛋白*LPL1*和*LPL2*。酶活性测定结果表明:*LPL1*和*LPL2*酶活性最适温度均为35℃,最适pH均为8.0。*LPL1*酶活性高于*LPL2*,推测可能与*LPL2*的<sup>83</sup>N位点突变所导致的N-糖基化位点缺失有关。

**关键词:** 鲤鱼; 脂蛋白脂肪酶; 基因克隆; 原核表达; 酶活性

**中图分类号:** S965.116 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)02-0414-10

## Cloning and expression of two genes encoding lipoprotein lipase of *Cyprinus carpio*

ZHOU Jie<sup>1</sup>, YU Ju-hua<sup>1,2</sup>, LI Hong-xia<sup>2</sup>, LI Jian-lin<sup>2</sup>, TANG Yong-kai<sup>2</sup>, YU Fan<sup>2</sup>

(1. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 2. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater, Ministry of Agriculture/Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** Two genes encoding lipoprotein lipase *LPL1* and *LPL2* in *Cyprinus carpio* were cloned and the expression patterns were characterized. The open reading frames of *LPL1* and *LPL2* were 1524 bp and 1503 bp in length, encoding 507 and 500 amino acids respectively. The amino acid shared 45.51% similarity. The functional sites of *LPL2*-encoded amino acid mutated from <sup>83</sup>N to <sup>83</sup>K. The real time fluorescence quantitative PCR revealed that the expression levels of *LPL1* and *LPL2* in the liver were the highest, followed by heart, fat, muscle, brain, kidney, and in the foregut was the lowest. In all tissues and organs the expression of *LPL1* was higher than that of *LPL2*. By constructing the prokaryotic expression vector *LPL1*-pEASY (E2) and *LPL2*-pEASY (E2), the fusion protein *LPL1* with molecular mass of  $5.55 \times 10^4$  and *LPL2* with

molecular mass of  $5.35 \times 10^4$  were obtained from the Transetta (DE3) after induced by 0.5 mmol/L isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG). The two enzymes presented the highest activities under the conditions of 35℃ and pH 8. The higher activity of *LPL1* may be caused by the loss of N-glycosylation site resulting from the mutation of <sup>83</sup>N site in *LPL2*.

**Key words:** *Cyprinus carpio*; lipoprotein lipase;

收稿日期:2015-11-19

基金项目:江苏省水产三新工程项目(Y2015-4);江苏省自然科学基金项目(BK20141096);中央级基本科研业务费项目(2015JBFM10)

作者简介:周杰(1989-),男,江苏东台人,硕士研究生,主要从事遗传育种与分子生物学研究。(Tel)18806172172,(E-mail)714203849@qq.com

通讯作者:俞菊华,(Tel)0510-85554198;(E-mail)dnase@163.com

gene cloning; prokaryotic expression; enzyme activity

脂蛋白脂肪酶(LPL)是一种限速酶<sup>[1]</sup>,水解血浆中乳糜微粒和极低密度脂蛋白中的甘油三酯<sup>[2]</sup>,使机体能够利用从食物中摄取以及肝脏中合成的脂肪,从而产生供组织利用的脂肪酸和单酰甘油,这一特性对于生物体能量代谢、信号转导以及凝血等机体重要生理反应具有不可替代的作用<sup>[3]</sup>。自从1987年Wion等<sup>[4]</sup>首次克隆得到人类LPL基因全长cDNA以来,迄今为止已克隆得到包括小鼠(*Mus musculus*)<sup>[5]</sup>、斑马鱼(*Danio rerio* BC064296)、真鲷(*Pagrus major*)<sup>[6]</sup>、欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)<sup>[7]</sup>、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)<sup>[8]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[9]</sup>、鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix* FJ436065)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella* FJ716100)等多种脊椎动物的LPL基因。研究发现在真鲷、斑马鱼、大马哈鱼、大口黑鲈等鱼类中存在2种脂蛋白脂肪酶(LPL1和LPL2),这两种脂肪酶互为同源物,并且在氨基酸序列上存在显著差异<sup>[10]</sup>,研究者推测这种现象是鱼类特有的第3轮全基因组复制的结果<sup>[11]</sup>。在LPL基因表达方面,虹鳟、大黄鱼、真鲷、大口黑鲈等鱼类中LPL基因在各组织中的表达呈现泛表达的特征,LPL基因在真鲷<sup>[12]</sup>脂肪组织中表达量最高,在金头鲷肠系膜组织中表达量最高,而在虹鳟<sup>[13]</sup>、大黄鱼<sup>[14]</sup>、大口黑鲈等较多鱼类中LPL基因则在肝脏组织中表达量最高。在鱼类摄食调控方面,研究发现LPL在虹鳟、斑马鱼等鱼类肝脏、肠道中的表达可以受到摄食和禁食条件的调控<sup>[15-16]</sup>,对于脂肪细胞来说,禁食会降低LPL表达,恢复进食后4h LPL表达得以恢复。在LPL酶活调控方面,脂肪细胞中LPL主要在翻译和翻译后水平上受到调控<sup>[17]</sup>。在草鱼中,复合微生物制剂能有效提高草鱼脂肪酶活性<sup>[18]</sup>。在鲈鱼中,卵巢组织中的LPL活性会随着卵巢的发育而逐渐升高<sup>[19-20]</sup>。在设定的温度和pH范围内,LPL的活性随着温度和pH的升高而呈现先升高后下降的变化趋势<sup>[21]</sup>。在饲料蛋白质和能量水平均能满足奥尼罗非鱼生长需要的基础上,饲料中分别以鱼油、茶油作为脂肪酸来源,能够分别提高和降低脂肪组织中LPL的活性<sup>[22]</sup>。

目前关于鲤鱼LPL2基因克隆、表达及其功能表达调控方面的研究没有报道。本研究通过克隆鲤鱼2种类型LPL基因(LPL1、LPL2)cDNA序列,在

mRNA水平上比较2种LPL在不同组织中的表达情况,在蛋白质水平上测定鲤鱼不同组织中LPL的含量,并探索温度、pH对LPL1、LPL2酶活性的影响,为研究鱼类脂肪代谢机制和鱼类营养需求,以及为鱼类的高健康养殖提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验用鱼 鲤鱼取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴养殖基地,所用鱼为当年人工繁殖的同池养殖鱼种,平均体质量70g,体长10~15cm。

1.1.2 试剂 Total RNA Kit、pMD18-T载体、EcoR I、Hind III、Xho I、Competent Cell Preparation Kit、荧光定量等试剂盒购自宝生物(大连)有限公司,胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、Taq DNA聚合酶等购自上海申能博彩生物科技有限公司,PrimeScript™ RT Master Mix购自Omega生物技术公司,pEASY-E2 Expression Kit购自北京全式金生物技术科技有限公司,High Affinity Ni-Charged Resin购自金思特科技(南京)有限公司,凯基全蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司,BCA蛋白质浓度测定试剂盒购自Biosharp公司,鱼脂蛋白脂肪酶(LPL)酶联免疫分析试剂盒购自南京建成生物科技有限公司,对硝基苯酚棕榈酸酯(p-NPP)购自Sigma公司,Millipore超滤管购自上海易佰聚生物科技有限公司。

1.1.3 引物 所有引物信息见表1。P1、P2用于扩增LPL1 cDNA序列,P3、P4用于扩增LPL2 cDNA序列。P5、P6为LPL1荧光定量特异引物,P7、P8为LPL2荧光定量特异引物。P9、P10为构建原核表达重组质粒设计的LPL1序列引物,P11、P12为构建原核表达重组质粒设计的LPL2序列引物。所有引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 RNA提取及cDNA合成 根据OMEGA Total RNA Kit试剂盒说明,提取鲤鱼各个组织中的总RNA,以Oligo dT为引物反转录成cDNA。

表1 试验中使用的引物

Table 1 The sequences of primers used in the experiment

引物	序列(5'→3')
P1	ATGGGGAGAGTACGCAGCGCTTG
P2	TTACTCGGTGCTCTGTTTGAATGAACTTC
P3	ATGAACATTTTGTCTATTCCAATGCGTTTC
P4	TTATTTGGCTTTTTCAGTTTGGGCTTTTAG
P5	GCAGATGCCCAAAGCACTCTTTTC
P6	GTTCTTGGCGCAGCTGAGACA
P7	GACGAATCACAGGTCTAGACCCAGC
P8	CAGCAGGGAGTTCGATGAACAGG
P9	ACGATTGAGCCAACGAGTGAATTTTC
P10	CTCGGTGCTCTGTTTGAATGAACTTC
P11	GAGAAAGAAATCTTCTCGAACGAAC
P12	TTGGCTTTTTCAGTTTGGGCTTT

1.2.2 鲤鱼 *LPL1*、*LPL2* 基因编码区 cDNA 序列克隆 使用 NCBI 数据库检索已有的斑马鱼相关 *LPL* 基因序列,在本实验室已有的鲤鱼肝脏转录组中筛选到相关同源序列,根据此序列设计引物(P1~P4)。20  $\mu$ l RT 反应体系中加入 5  $\mu$ g 肝脏 RNA,使用逆转录酶 *M-MLV*,以 Oligo dT 为引物进行 RT 扩增,合成出 cDNA 第 1 条链。50  $\mu$ l PCR 反应体系中,以 RT 产物为模板,使用 P1、P2 及 P3、P4 进行扩增。经 RT-PCR 扩增后的产物通过琼脂糖凝胶电泳分离、纯化,再经克隆鉴定送至上海博尚生物有限公司进行测序、拼接,最终得到 *LPL1* 和 *LPL2* 基因完整的 cDNA 编码区序列。

1.2.3 序列分析 采用 ExPASy 在线工具对 *LPL1* 和 *LPL2* 蛋白质的氨基酸理化性质进行预测分析,通过 DNAMAN6 软件分析 *LPL1* 和 *LPL2* 基因的核苷酸序列并进行氨基酸同源序列比对,使用 MEGA5.1 软件构建 NJ 系统发育树。

1.2.4 鲤鱼 *LPL1*、*LPL2* mRNA 组织分布以及组织中 *LPL* 浓度测定 荧光定量选用 SYBR Green 作为结合染料,选用 Beta-actin 作为内标基因,通过溶解曲线检测产物的特异性。根据 Real-Time PCR 分析结果,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算分析 *LPL1*、*LPL2* 基因在鲤鱼肝脏、肌肉、脂肪、心脏等组织中的表达情况。采用凯基全蛋白提取

试剂盒,提取鲤鱼肝脏、肌肉、脂肪、心脏组织中的全蛋白,通过 BCA 蛋白浓度测定法、鱼脂蛋白脂酶(*LPL*)酶联免疫法测定各组织中 *LPL* 的含量。

1.2.5 原核表达蛋白纯化、复性 选用大肠杆菌 Transetta( DE3) 表达菌株,及全式金生物公司的 pEASY(E2) 表达载体,构建 *LPLs*-pEASY(E2)-Transetta( DE3) 原核表达系统。用 100 ml 富集培养基,将扩大培养之后菌液转移至富集培养基中,在 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养。当菌液  $OD_{600}$  达到 0.5~0.8 时,加入 0.5 mmol/L IPTG, 28  $^{\circ}$ C、170 r/min 条件下诱导 10 h 后收集菌体,以未加 IPTG 的菌体作为空白对照。诱导结束后,从诱导菌液和对照菌液中各吸取 1 ml 菌液,离心弃上清,用 200  $\mu$ l 1 $\times$ PBS 缓冲液打散菌体,加入 50  $\mu$ l 5 $\times$ SDS 上样缓冲液,混匀,沸水煮 20 min, 4  $^{\circ}$ C 离心 10 min,各取上清 20  $\mu$ l 进行 SDS-PAGE 电泳,分析蛋白质表达结果。剩余菌液在 4  $^{\circ}$ C 离心收集后,用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤沉淀 2 次,加入菌体裂解液,冰上超声破碎,收集超声后的液体, 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min,离心 10 min。上清液转移至 EP 管中,沉淀加入适量 1 $\times$ PBS 缓冲液重悬。分别取 200  $\mu$ l 上清和沉淀重悬液 200  $\mu$ l,加入 50  $\mu$ l 5 $\times$ SDS 上样缓冲液,混匀,沸水煮 20 min,离心取上清进行 SDS-PAGE 分析。蛋白质纯化采用镍柱亲和层析纯化方法,纯化的蛋白质经过 Millipore 超滤管(10 KD)超滤之后,取 200  $\mu$ l,加入 50  $\mu$ l 5 $\times$ SDS 上样缓冲液,混匀,沸水煮 20 min,离心 10 min,SDS-PAGE 电泳分析。蛋白质浓度测定采用 Biosharp 公司的 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒。

1.2.6 *LPL1*、*LPL2* 催化活性测定 脂蛋白脂肪酶活性单位定义为:在一定条件下,1 min 释放出 1  $\mu$ mol 对硝基苯酚的酶量定义为 1 个脂肪酶活性单位(U)。*LPL* 酶活性测定采用对硝基苯酚法。分别配制浓度为 1 mmol/L 的底物溶液(对硝基苯酚棕榈酸酯 p-NPP)和 0.1 mmol/L 的标准溶液(对硝基苯酚 p-NP),将 p-NP 标准溶液用去离子水分别稀释成 0.001 0 mmol/L、0.010 0 mmol/L、0.012 5 mmol/L、0.025 0 mmol/L、0.050 0 mmol/L、0.100 0 mmol/L 的梯度。在 96 孔酶标板中依次加入 100  $\mu$ l 各浓度

梯度的 p-NP, 每个样品设 1 个空白对照, 3 个平行样, 空白对照中加入灭活样品。加入 100  $\mu\text{l}$  浓度为 1 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液, 在 410 nm 处分别测定各孔吸光度, 绘制 p-NP 吸光度-浓度标准曲线。p-NPP 用异丙醇溶液溶解之后, 与磷酸盐缓冲液按照 1:9 的比例稀释, 分别配制成 pH4.0、pH6.0、pH8.0、pH9.0、pH10.0 的底物溶液, 溶液中加入 1% 总体积的 Triton100。取 50  $\mu\text{l}$  底物溶液, 在不同温度下 (20~40  $^{\circ}\text{C}$ ) 预热 5 min 后加入 10  $\mu\text{l}$  酶液和 40  $\mu\text{l}$  去离子水。每个样品设 1 个空白对照, 3 个平行样, 空白对照中加入灭活样品, 放置于酶标仪上在相应温度下 (20~40  $^{\circ}\text{C}$ ) 反应 10 min 后加入 100  $\mu\text{l}$  浓度为 1 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液, 在 410 nm 处测定吸光度。对照标准曲线计算出生成的对硝基苯酚浓度, 进而计算出酶活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 鲤鱼 LPL1 和 LPL2 cDNA 序列

LPL1 cDNA 编码区全长 1 524 bp, 编码 507 个氨基酸; LPL2 cDNA 编码区全长 1 503 bp, 编码 500 个氨基酸。ExPASy 在线工具预测结果表明 LPL1 和 LPL2 蛋白质的等电点分别为 8.54 和 7.95, 分子量分别为  $5.773 \times 10^4$  和  $5.615 \times 10^4$ 。

### 2.2 LPL1 和 LPL2 蛋白质氨基酸序列同源性比较

使用 DNAMAN 软件, 将鲤鱼 LPL1 和 LPL2 的氨基酸序列与其他物种 LPL 氨基酸序列进行同源性比较。结果 (图 1) 显示 LPL1 和 LPL2 之间的氨基酸序列相似性为 45.51%, 部分比对结果见表 2。鲤鱼 LPL1 与哺乳动物人、鸡的相似性分别为 58.02%、59.51%, 与 1 型斑马鱼相似性为 87.38%, 与 2 型斑马鱼相似性为 45.27%, 与大黄鱼、东方金枪鱼、伯氏朴丽鱼、金头鲷、真鲷、翘嘴鲈的相似性分别为 44.97%、45.17%、44.38%、46.75%、69.43%、88.56%。鲤鱼 LPL2 与哺乳动物人、鸡的相似性分别为 50.74%、50.21%, 与 1 型斑马鱼的相似性为 42.37%, 与 2 型斑马鱼的相似性为 81.56%, 与真鲷、翘嘴鲈、东方金枪鱼、金头鲷、伯氏朴丽鱼、大黄鱼的相似性分别为 43.5%、44.28%、67.87%、67.42%、65.93%、67.27%。

### 2.3 基于 LPL 氨基酸序列构建的系统发育树

根据分离的鲤鱼 LPL1、LPL2 的氨基酸序列以

及 NCBI 基因库中其他物种的相关序列, 使用 MEGA5.0 软件构建 NJ 系统发育树 (图 2), 其中选用黑腹果蝇 HSL (*Drosophila melanogaster* HSL) 作为外群。系统发育树显示, 鲤鱼 LPL1 和 LPL2 分属两支。LPL1 中鲤鱼和同为鲤科的鲫鱼聚在一起, 然后与团头鲂、翘嘴红鲌、鲢鱼、草鱼、斑马鱼聚为一支, 随后与斑点叉尾鲷、虹鳟、真鲷、斜带石斑鱼聚为一支, 最后与哺乳类的非洲爪蟾、短吻鳄、人、褐家鼠聚为一大支。LPL2 中鲤鱼和同为鲤形目的斑马鱼聚为一支, 然后与钩吻螯虾、伯氏朴丽鱼、深裂眶锯雀鲷、真鲷、金头鲷、大黄鱼、东方金枪鱼、鲈鱼聚为一支。

### 2.4 鲤鱼 LPL1 和 LPL2 mRNA 的组织 (器官) 分布以及组织中 LPL 浓度

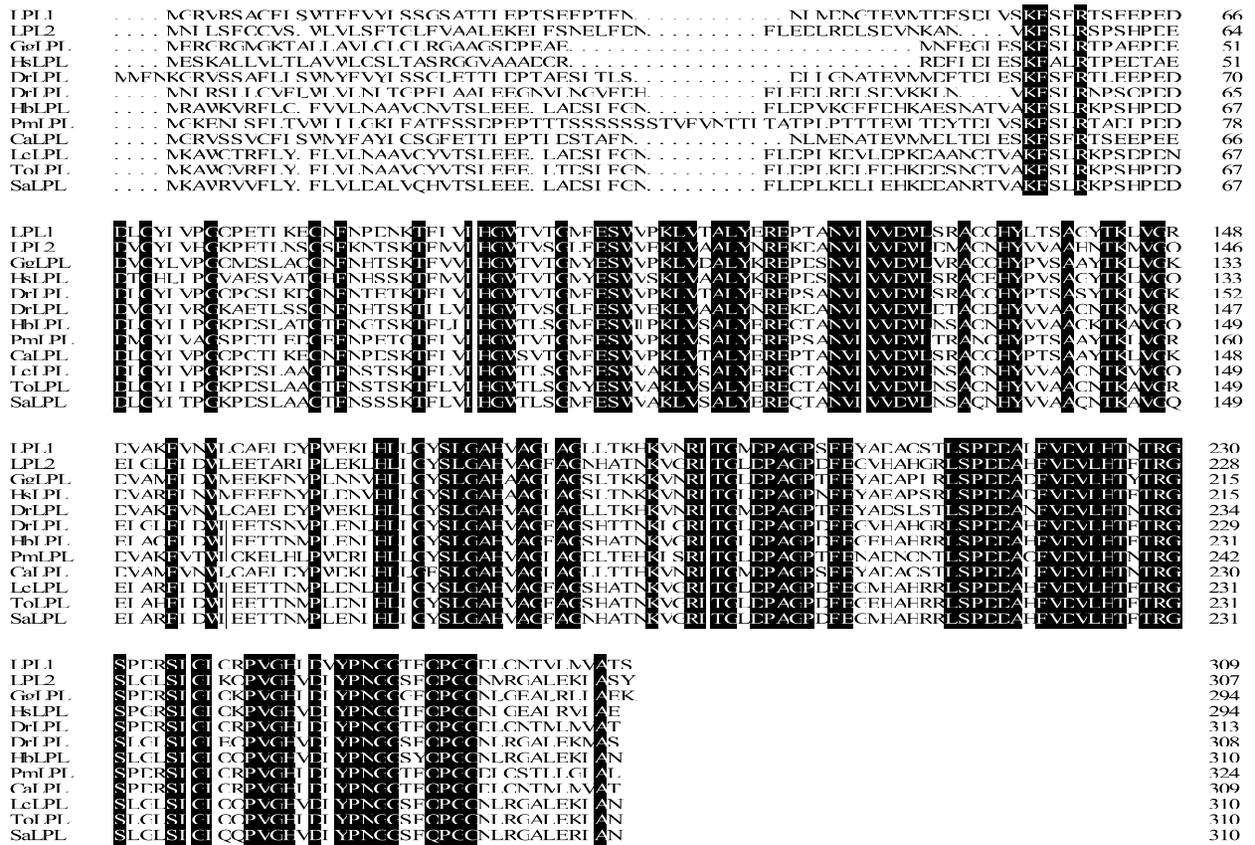
荧光定量 RT-PCR 分析结果表明, 鲤鱼 LPL1、LPL2 mRNA 在不同组织中的相对表达量差异很大 (图 3)。其中, 鲤鱼 LPL1 在肝脏中表达量最高, 其次在心脏、脂肪、肌肉、脑、肾中, 在前肠中表达量最小; LPL2 在肝脏中的表达量也是最高, 其次在心脏、脂肪、肌肉、脑、肾中, 在前肠中表达量最少。在相同组织中, LPL1 的表达量始终高于 LPL2。

BCA 法测得鲤鱼肝脏、心脏、脂肪、肌肉中总蛋白质浓度分别为 7.512  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、4.718  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、2.802  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、2.504  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 酶联法测得鲤鱼肝脏、心脏、脂肪、肌肉中 LPL 浓度分别为 6.381 U/g、6.073 U/g、5.594 U/g、3.609 U/g。通过 ELISA 法测得组织中的总脂蛋白脂肪酶含量和 LPL 在 mRNA 水平上的表达量保持一致。

### 2.5 脂蛋白脂肪酶的原核表达及蛋白质纯化

构建的原核表达系统 pEASY (E2)-LPLs-Transsetta (DE3) 经 IPTG 诱导后, 特异性地表达了融合蛋白 (图 4)。对收集的菌体超声破碎, 离心后得到的上清液和沉淀分别进行电泳, 结果 (图 5) 显示经诱导后融合蛋白在上清液中的表达量很小, 而在沉淀中表达量很大, 因此确定 LPL1 和 LPL2 主要以包涵体的形式存在。

经过镍柱亲和层析纯化的蛋白质, 在 SDS-PAGE 电泳检测后得到单一条带 (图 6)。纯化后的蛋白质经浓缩之后, 用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定得到 LPL1 的浓度为 0.235  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , LPL2 的浓度为 0.332  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。



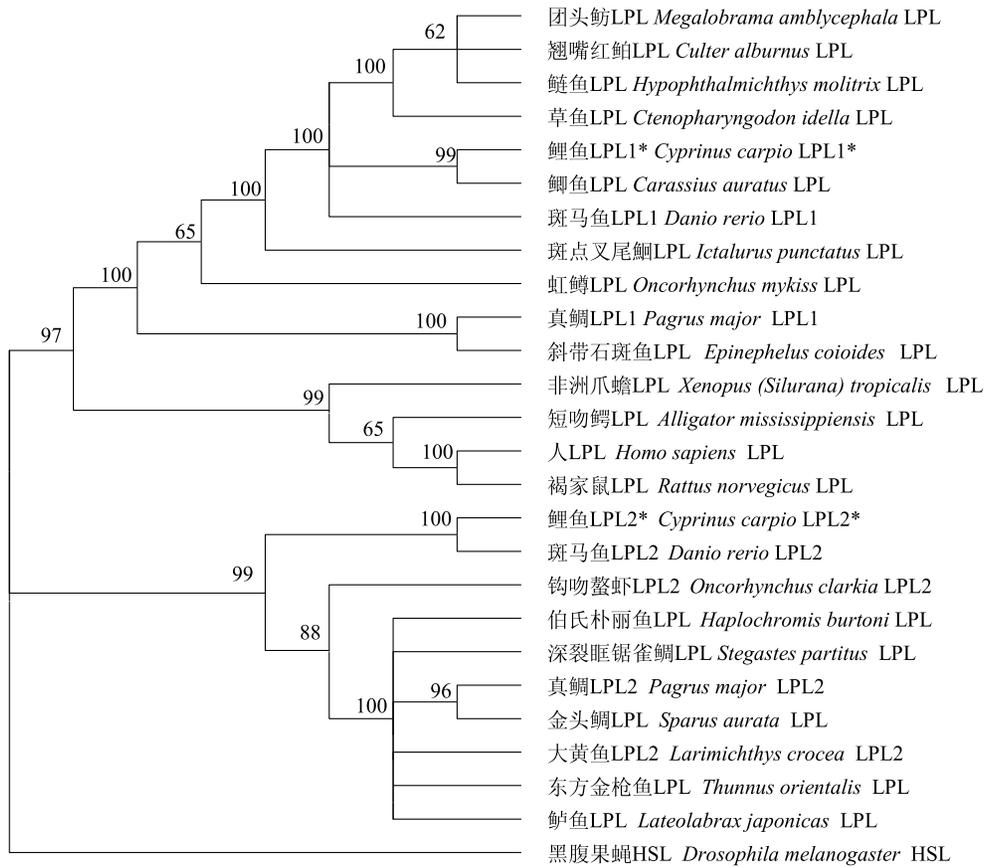
Lc: 鲤鱼; Gg: 鸡; Hs: 人; Dr: 斑马鱼; Hb: 伯氏朴丽鱼; Pm: 真鲷; Ca: 翘嘴鲌; Lc: 大黄花; To: 东方金枪鱼; Sa: 金头鲷。在序列中相同氨基酸序列用黑色背影表示。主要功能域: 信号肽(单横线)、活性位点(圆形)、二聚体形成的保守疏水残基位点(菱形)、N-糖基化位点(正方形)、肝素结合域(双横线)。

图1 鲤鱼 LPL1 和 LPL2 氨基酸序列与其他物种 LPL 氨基酸序列对比图  
 Fig.1 Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of *Cyprinus carpio* (Cc) LPL1 and LPL2 with the corresponding sequences from other species

表2 基于氨基酸序列的鲤鱼LPL1、LPL2与其他物种LPL的同源性

Table 2 The similarities of the deduced LPL amino acid sequences between *C. carpio* and other species

物种	与鲤鱼LPL1的同源性(%)	与鲤鱼LPL2的同源性(%)
人LPL ( <i>Homo sapiens</i> LPL)	58.02	50.74
鸡LPL ( <i>Gallus gallus</i> LPL)	59.51	50.21
东方金枪鱼LPL ( <i>Thunnus orientalis</i> LPL)	45.17	67.87
金头鲷LPL ( <i>Sparus aurata</i> LPL)	46.75	67.42
真鲷LPL ( <i>Pagrus major</i> LPL)	69.43	43.50
伯氏朴丽鱼LPL ( <i>Haplochromis burtoni</i> LPL)	44.38	65.93
翘嘴鲌LPL ( <i>Culter alburnus</i> LPL)	88.56	44.28
斑马鱼LPL1 ( <i>Danio rerio</i> LPL1)	87.38	42.37
斑马鱼LPL2 ( <i>Danio rerio</i> LPL2)	45.27	81.56
大黄鱼LPL ( <i>Larimichthys crocea</i> LPL)	44.97	67.27



\* 表示本研究分离;团头鲂 LPL(AGQ42625.1);翘嘴红鲌 LPL(AGT80484.1);鲢鱼 LPL( ACT22640.1);草鱼 LPL( ACN66300.1);鲫鱼 LPL( ACN37860.1);斑马鱼 LPL1(NP\_571202.1)、LPL2(XP\_002666287.3);斑点叉尾鲷 LPL( AHA83386.1);虹鳟 LPL( NP\_001118076.1);真鲷 LPL1(BAE95413.1)、LPL2(BAB20997.1);斜带石斑鱼 LPL( ACH53599.1);非洲爪蟾 LPL( XP\_002934038.1);短吻鳄 LPL( XP\_006268794.1);人 LPL(CAG33335.1);褐家鼠 LPL(AAH81836.1);钩吻螯虾 LPL2( AFL69953.1);伯氏朴丽鱼 LPL( XP\_005920850.1);深裂眶锯雀鲷 LPL( XP\_008290814.1);金头鲷 LPL( AFP97558.1);大黄鱼 LPL2( AKG97518.1);东方金枪鱼 LPL( BAF98179.1);鲈鱼 LPL( AKG97517.1);黑腹果蝇 HSL( NP\_611463.1)。

图2 基于LPL氨基酸序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of LPL

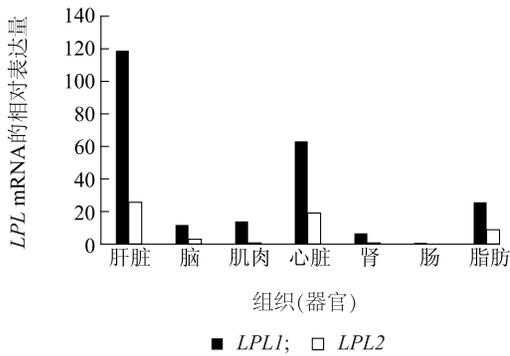
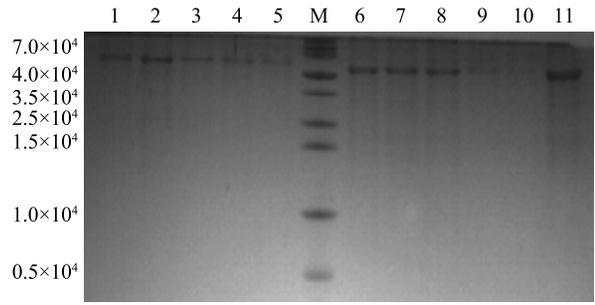
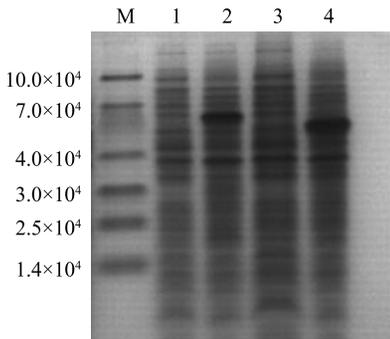


图3 鲤鱼 LPL1、LPL2 在组织(器官)中的相对表达量  
Fig.3 The relative expression level of LPL1 and LPL2 in *C. carpio*

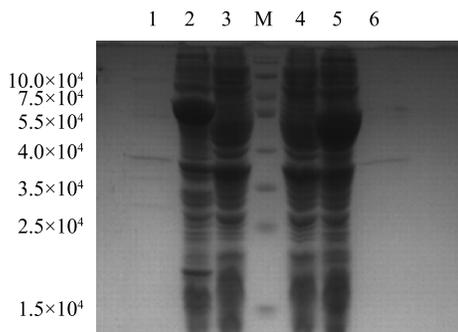


M: 预染蛋白质 Marker; 1~5: 纯化 LPL1 收集的 5 管蛋白质; 6~11: 纯化 LPL2 收集的 6 管蛋白质。

图6 纯化后的鲤鱼 LPL 蛋白质  
Fig.6 The purified protein of *C. carpio* LPL



M: 预染蛋白 Marker; 1: 未加 IPTG 的 LPL1 表达; 2: 加入 IPTG 的 LPL1 表达; 3: 未加 IPTG 的 LPL2 表达; 4: 加入 IPTG 的 LPL2 表达。  
图4 鲤鱼 LPL 融合蛋白的表达  
Fig.4 Expression of fusion protein of *C. carpio* LPL



M: 预染蛋白 Marker; 1: 上清液中 LPL1; 2: 包涵体中 LPL1; 3: 未加 IPTG 的 LPL1; 4: 未加 IPTG 的 LPL2; 5: 包涵体中 LPL2; 6: 上清液中 LPL2。  
图5 鲤鱼 LPL 蛋白质的可溶性鉴定  
Fig.5 Solubility identification of *C. carpio* LPL protein

2.6 温度、pH 对鲤鱼 LPL1、LPL2 酶活性的影响  
从图 7 可以看出, 在 20~40 °C 的反应体系中,

LPL1 和 LPL2 都具有活性, 随着反应温度的上升酶活性逐渐变大而后降低。LPL1 和 LPL2 酶活性的最适温度均为 35 °C。在 20~40 °C, LPL1 的活性始终高于 LPL2 的活性。在 20 °C 时, LPL1 和 LPL2 活性分别为最高活性的 61% 和 50%。当温度升至 40 °C 时, LPL1 和 LPL2 活性分别为最高活性的 68% 和 62%, 说明与 LPL2 相比, LPL1 具有较好的温度稳定性。

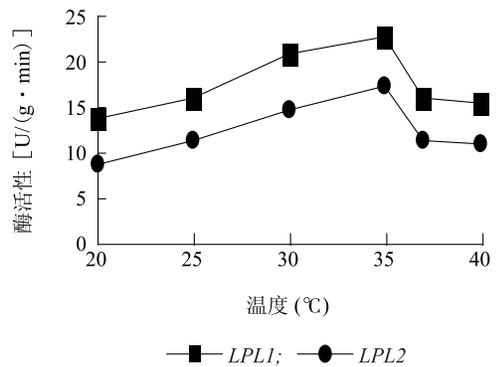


图7 温度对鲤鱼脂蛋白脂肪酶活性的影响  
Fig.7 The activity of lipoprotein lipase of *C. carpio* in response to temperature

在 pH 4~10 的反应体系中, LPL1 和 LPL2 都具有活性(图 8)。在 pH 4~10, LPL1、LPL2 随着反应体系 pH 值的上升酶活性逐渐变大而后降低。LPL1 和 LPL2 酶活性的最适 pH 均为 8.0。在 pH 4~10, LPL1 活性始终高于 LPL2 活性。在 pH 4~6, LPL1 和 LPL2 的活性都很低; 当 pH 达到 8 时, LPL1 和 LPL2 的活性达到最大。

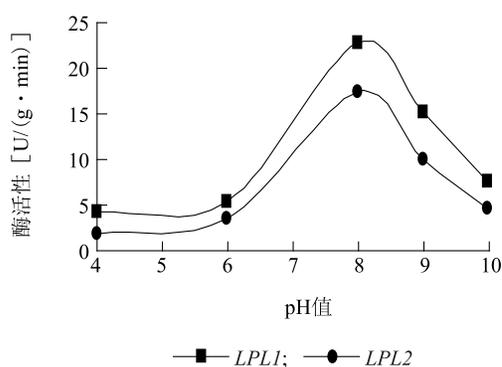


图8 pH 值对鲤脂蛋白脂肪酶活性的影响

Fig.8 The activity of lipoprotein lipase of *C. carpio* in response to pH

### 3 讨论

#### 3.1 鲤鱼 *LPL1*、*LPL2* 基因序列分析

本研究分析了鲤鱼 *LPL1* 和 *LPL2* 开放阅读框 cDNA 序列,结果表明 *LPL1* cDNA 编码区全长 1 524 bp,编码 507 个氨基酸;*LPL2* cDNA 编码区全长 1 503 bp,编码 500 个氨基酸。鲤鱼 *LPL2* 比 *LPL1* 少 7 个氨基酸,主要表现为 N 端部分序列的缺失。比对分析发现,鲤鱼 *LPL1* 和 *LPL2* 的氨基酸序列同源性只有 45.51%,高于大口黑鲈中 *LPL1* 和 *LPL2* 氨基酸序列同源性(43.5%)<sup>[23]</sup>。本研究克隆的鲤鱼 *LPL1* 和 *LPL2* 主要功能域都存在,并且在氨基酸序列上与其他鱼类相比比较保守,说明本研究克隆的序列就是鲤鱼 *LPL1* 和 *LPL2* 基因序列。由系统发育树可见鲤鱼 *LPL1* 和哺乳动物 *LPL* 聚为一支,而鲤鱼 *LPL2* 则和真鲷、金头鲷、大黄鱼等聚为一支。鱼类存在 2 种类型的 *LPL*,可能是鱼类特有的第 3 轮全基因组复制的结果,而哺乳动物只存在 1 种类型的 *LPL*,可能跟哺乳动物在进化过程中 *LPL2* 的丢失有关。

#### 3.2 鲤鱼 *LPL1*、*LPL2* 在各组织(器官)中的表达差异

脂蛋白脂肪酶是由组织(器官)中的实质细胞合成后分泌到胞外,同一种组织合成的 *LPL* 不会通过血液循环系统运送到机体的其他组织(器官)中发挥作用<sup>[24]</sup>,这在一定程度上确保了用荧光定量技术检测鲤鱼各组织(器官)中 *LPL1*、*LPL2* 表达量的准确性。

*LPL1* 和 *LPL2* 在鲤鱼各组织(器官)中呈现出

泛表达的特征,这与哺乳动物表达特征不同。哺乳动物在其出生后肝脏 *LPL* 停止表达,在成人的肝脏中检测不到 *LPL* 的表达<sup>[25]</sup>。鲤鱼 *LPL1* 和 *LPL2* 均在肝脏中表达量最高,这可能跟鱼类缺乏皮下脂肪层,肝脏是其脂肪蓄积部位有关<sup>[26]</sup>。在草鱼、金头鲷、虹鳟、真鲷的肝脏中也都有 *LPL* 的大量表达<sup>[27]</sup>。在鲤鱼不同组织(器官)中,*LPL1* 和 *LPL2* 表达的水平并不完全相同,可能与长期进化使不同组织(器官)中 *LPL* 在脂肪代谢中发挥的作用不同有关。酶联免疫法测定结果表明,组织(器官)中 *LPL* 蛋白质总含量与 *LPL1*、*LPL2* 在 mRNA 水平的表达量保持一致,符合基因表达的特征。

#### 3.3 鲤鱼 *LPL1*、*LPL2* 的原核表达

为了获得大量高纯度的表达蛋白,选择合适、高效的表达载体是关键,较多研究者采用 pET32a(+) 作为表达载体,均获得了高产量的包涵体蛋白<sup>[28-29]</sup>。另外通过温度与诱导剂浓度的调整,可获得高纯度的可溶蛋白<sup>[30]</sup>。本研究选用高效表达载体 pEASY-E2,将 *LPL1*、*LPL2* 基因目的片段与其相连接,成功构建了 pEASY(E2)-*LPLs* 原核表达载体,在大肠杆菌 Transetta(DE3)中经过 IPTG 诱导,高效表达出相对分子量分别为  $5.55 \times 10^4$ 、 $5.35 \times 10^4$  的融合蛋白,随后经过 Ni-NTA 亲和层析纯化、复性、超滤,获得了高纯度的融合蛋白。

#### 3.4 温度和 pH 值对 *LPL1* 和 *LPL2* 酶活性的影响

目前关于脂蛋白脂肪酶活性的测定大多采用碱滴定法、对硝基苯酚法、铜皂法 3 种常用的方法。对硝基苯酚法与碱滴定法相比,具有能有效地终止反应,结果更稳定,重复性更好的特点,与铜皂法相比用时更短,是进行大批量脂肪酶活性快速测定的较好选择<sup>[31]</sup>。因此本研究采用对硝基苯酚法测定了原核表达纯化的 *LPL1*、*LPL2* 在底物充足的情况下,不同温度和 pH 范围内的酶活性。

John<sup>[32]</sup>认为,鱼类脂蛋白脂肪酶活性的最适温度一般为 30~50 °C。李加儿等<sup>[33]</sup>的研究结果表明内斜带髯鲷消化道不同部位脂蛋白脂肪酶活性的最适温度均为 35 °C。本研究中鲤鱼 *LPL1* 和 *LPL2* 酶活性的最适温度与上述研究结果一致。鲤鱼生长的适宜温度是 20~28 °C,从脂蛋白脂肪酶活性的最适温度与环境温度相比较来看,水体环境的温度难以维持脂蛋白脂肪酶活性所需要的最适温度,这一点与桂远明等<sup>[34]</sup>在研究温度与鱼消化酶作用关系时

的结论相近似,虾类也存在类似现象<sup>[35]</sup>。究其原因,可能跟鲤鱼体内复杂的环境有关,而且试验中测定的脂蛋白脂肪酶活性是在一定的限制性条件下进行的,所以最适温度只有在一定条件下才有意义,但在一定程度上反应了温度对脂蛋白脂肪酶的影响规律。

大多数鱼类脂蛋白脂肪酶的最适 pH 处于碱性范围,金头鲷 (*Sparus aurata*) 为 pH8<sup>[36]</sup>, 鲑 (*Salmon salar*) 为 pH7.5<sup>[37]</sup>, 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 为 pH7.8<sup>[38]</sup>。鲤鱼 *LPL1* 和 *LPL2* 的最适 pH 为 8, 与这些鱼类基本相似。脂蛋白脂肪酶的最适 pH 偏碱性,说明偏碱性条件有利于脂蛋白脂肪酶活力的发挥,这可能与鱼类适宜生长在偏碱性的水环境中有关。

在相同的反应条件下,*LPL1* 酶活性始终高于 *LPL2* 酶活性,这可能与 *LPL1* 和 *LPL2* 的 N-糖基化差异有关。经过氨基酸序列比对和功能结构分析发现,本实验克隆的 2 种 *LPL* 二聚体形成位点、活性中心位点、肝素结合域都很保守,只有 N-糖基化位点存在显著差异,而 N-糖基化是脂蛋白脂肪酶维持其催化活性的必要条件<sup>[39]</sup>,*LPL1* 存在 2 个 N-糖基化位点 (Asn<sup>85</sup> 和 Asn<sup>401</sup>),*LPL2* 的<sup>83</sup>N 位点突变导致只存在 1 个 N-糖基化位点 (Asn<sup>400</sup>)。

#### 参考文献:

- [1] GOLDBERG A P, CHAIT A, BRUNZELL J D. Postprandial adipose tissue lipoprotein lipase activity in primary hypertriglyceridemia [J]. *Metabolism*, 1980, 29(3): 223-229.
- [2] MASUNO H, SCHULTZ C J, PARK J W, et al. Glycosylation, activity and secretion of lipoprotein lipase in cultured brown adipocytes of newborn mice. Effect of tunicamycin, monensin, 1-deoxymannojirimycin and swainsonine [J]. *Biochem*, 1991, 277(3): 801-809.
- [3] WONG H, SCHOTZ M C. The lipase gene family [J]. *Lipid Res*, 2002, 43(7): 993-999.
- [4] WION K L, KIRCHGESSNER T G, LUSIS A J, et al. Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence [J]. *Science*, 1987, 235(4796): 1638-1641.
- [5] EDWARDS W D, DANIELS S E, PAGE R A, et al. Cloning and sequencing of a full length cDNA encoding ovine lipoprotein lipase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1172(1-2): 167-170.
- [6] OKU H, OGATA H Y, LIANG X F. Organization of the lipoprotein lipase gene of red sea bream *Pagrus Major* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 131(4): 775-785.
- [7] JOSE-IBANEZ A, PEINADO-ONSURBE J, SANCHEZ E, et al. Lipoprotein lipase (LPL) is highly expressed and active in the ovary of European seabass (*Dicentrarchus labrax*), during gonadal development [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2008, 150(3): 347-354.
- [8] 朱择敏, 马冬梅, 白俊杰, 等. 大口黑鲈两种脂蛋白脂肪酶基因 cDNA 的克隆及表达特征分析 [J]. *水产学报*, 2013, 37(5): 641-650.
- [9] LINDBERG A, OLIVECRONA G. Lipoprotein lipase from rainbow trout differs in several respects from the enzyme in mammals [J]. *Gemm*, 2002, 292(1-2): 213-223.
- [10] GILLER T, BUCHWALD P, BLUM-KAELIN D, et al. Two novel human pancreatic lipase related proteins, hPLRP1 and hPLRP2: differences in colipase dependence and in lipase activity [J]. *Biol Chem*, 1992, 267(23): 16509-16516.
- [11] 濮剑威, 孙成飞, 蒋霞云, 等. 草鱼两个肌肉生长抑制素 cDNA 克隆、表达及过量表达对胚胎发育的影响 [J]. *生物技术通报*, 2011, 27(8): 153-166.
- [12] OKU H, KOIZUMI N, OKUMURA T, et al. Molecular characterization of lipoprotein lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase genes: Effects of fasting and refeeding on their gene expression in red sea bream *Pagrus major* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2006, 145(2): 168-178.
- [13] AMAYA A, SANCHEZ-GURMAEHES J, GUTIERREZ J, et al. Regulation of lipoprotein lipase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues [J]. *Gen Comp Endocrin*, 2006, 146(3): 226-235.
- [14] 周旋, 王志勇, 姚翠鸾. 大黄鱼部分脂肪代谢相关基因的克隆及其表达分析 [D]. 厦门: 集美大学, 2010.
- [15] LIANG X, OKU H, OGATA H Y. The 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*, 2002, 131: 335-342.
- [16] OGATA H Y, SHEARER K D. Influence of dietary fat and adiposity on feed intake of juvenile red sea bream *Pagrus major* [J]. *Aquaculture*, 2000, 189(3-4): 237-249.
- [17] OGATA H Y, OKU H. The effects of dietary retinoic acid on body lipid deposition in juvenile red sea bream (*Pagrus major*); a preliminary study [J]. *Aquaculture*, 2001, 193(3-4): 271-279.
- [18] 温茹淑, 郑清梅, 刘兴隆, 等. 复合微生物制剂对草鱼生长与消化酶活性的影响 [J]. *安徽农业科学*, 2007(13): 3880-3881.
- [19] JOSÉ I A, PEINADO-ONSURBE J, SÁNCHEZ E, et al. Lipoprotein lipase (LPL) is highly expressed and active in the ovary of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), during gonadal development [J]. *Comp Biochem Physiol A*, 2008, 150(3): 347-354.
- [20] SEMENKOVICH C F, LUO C C, NAKANISHI M K, et al. *In vitro* expression and site-specific mutagenesis of the cloned human lipoprotein lipase gene. Potential N-linked glycosylation site aspar-

- agine 43 is important for both enzyme activity and secretion[J]. *J Biol Chem*, 1990, 265 (10): 5429-5433.
- [21] 韩春艳, 郑清梅, 冯丽娜. 饲料中不同的脂肪来源对奥尼罗非鱼体脂沉积、MDH 和 LPL 活性及 mRNA 表达的影响[C]// 中国水产学会. 2011 年中国水产学会学术年会论文摘要集, 北京: 海洋出版社, 2011.
- [22] 韩庆, 刘良国, 张建平, 等. 温度和 pH 对洞庭鲢鱼消化酶活性的影响[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(1): 22-29.
- [23] 周莉, 汪洋, 桂建芳. 鱼类特有的基因组复制[J]. *动物学研究*, 2006, 27(5): 525-532.
- [24] AUWERX J, LEROY P, SCHOONJANS K. Lipoprotein lipase: Recent contributions from molecular biology[J]. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 1992, 29(3-4): 243-268.
- [25] 周冰, 曾武威, 孙国涛, 等. 树鼩脂蛋白脂肪酶的 cDNA 克隆组织分布及活性测定[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15(11): 801-804.
- [26] 梁旭方, 白俊杰, 劳海华, 等. 真鲷脂蛋白脂肪酶基因表达与内脏脂肪蓄积营养调控定量研究[J]. *海洋与湖沼*, 2003, 34(6): 625-631.
- [27] CHENG H L, MENG X P, SUN S P, et al. Cloning and expression analysis of a cDNA encoding lipoprotein lipase from the liver of adult grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Aquaculture Research*, 2009, 40(16): 1838-1848.
- [28] 高涵, 薛利军, 刘小北, 等. 幽门螺杆菌 BabA 蛋白 N 段的基因克隆、表达纯化及体外粘附活性评价[J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(3): 34-40.
- [29] GASPARIAN M E, OSTAPCHENKO V G, YAGOLOVICH A V. Overexpression and refolding of thioredoxin TRAIL fusion from inclusion bodies and further purification of TRAIL after cleavage by enteropeptidase [J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29 (10): 1567-1573.
- [30] 曹燕娟, 胡东生, 刘志刚, 等. 牛奶主要过敏原  $\alpha$ s1 酪蛋白全长与片段区基因的克隆表达、纯化及免疫原性鉴定[J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(7): 601-605.
- [31] 江慧芳, 王雅琴, 刘春国. 三种脂肪酶活力测定方法的比较及改进[J]. *化学与生物工程*, 2007(8): 72-75.
- [32] JOHN E H. *Fish nutrition* [M]. California: Academic Press Inc, 1987: 332-423.
- [33] 李加儿, 张建强, 许晓娟, 等. 温度和 pH 值对斜带髯鲷蛋白酶、淀粉酶活性的影响[J]. *渔业科学进展*, 2009, 30(3): 7-12.
- [34] 桂远明, 刘垠, 刘焕亮, 等. 温度对草鱼、鲤、鲢、鳙主要消化酶活性的影响[J]. *大连水产学院学报*, 1993, 7(4): 2-8.
- [35] 沈文英, 胡洪国, 潘雅娟. 温度和 pH 值对南美白对虾消化酶活性的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(6): 543-548.
- [36] MOYANO F J, SARASQUETE M C. A screening on some digestive enzyme activities of gilt head seabream (*Sparus aurata*) larvae [J]. *Oostende Belgium European Aquaculture Sac*, 1993, 4: 4163.
- [37] KOLODZEISKAYA M V, VEREBKA S V. Chromatography of trypsin and chymotrypsin-like salmon proteases on sawdust [J]. *Appl Biochem Microbiol*, 1990, 25(5): 528-531.
- [38] HIDALGO M C, UREA E, SANZ A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Photo lytic and amylase activities [J]. *Aquaculture*, 1999, 170: 267-283.
- [39] ZHANG L Y, LOOKENE A, WU G S, et al. Calcium triggers folding of lipoprotein lipase into active dimers [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(52): 42580-42591.

(责任编辑: 张震林)