

泥鳅 *elovl1* 基因克隆、表达分析 及其在低温胁迫下的响应

张义凤 王丽伟 曹小娟 高 坚

华中农业大学水产学院/农业动物遗传育种与繁育教育部重点实验室/农业部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070

摘要 为探究泥鳅 ELOVL1 的功能和作用, 采用 RT-PCR 和 RACE 方法克隆泥鳅的 *elovl1* 基因, 并分析 *elovl1* 基因的表达规律, 最后将泥鳅分别暴露在 26 °C 和 8 °C 下饲养 30 d, 研究低温胁迫对泥鳅脂肪酸组成、组织形态及 *elovl1* 基因表达的影响。结果发现: *elovl1a* 全长为 2 216 bp, ORF 为 948 bp, 编码 315 个氨基酸; *elovl1b* 全长为 1 895 bp, ORF 为 963 bp, 编码 320 个氨基酸。氨基酸序列特征如下: 1 个高保守的氧化还原组氨酸簇 (HXXXHH), 多个跨膜区, 氨基酸序列 C 端均含有内质网滞留信号 (KXKXX)。 *elovl1a* 和 *elovl1b* 在所有组织中表达, *elovl1a* 在每个组织的表达量均低于 *elovl1b*。低温下总 SFA 明显降低 ($P < 0.05$), 总 MUFA 显著增加 ($P < 0.05$)。低温显著诱导 *elovl1a*, *elovl1b* 表达。研究结果表明: 泥鳅 ELOVL1 在脊椎动物中保守, ELOVL1 可能在机体适应低温时, 参与产生能量, 起到重要的作用。

关键词 泥鳅; 长链脂肪酸延长酶 1; 基因克隆; 低温应激; 脂肪酸组成

中图分类号 Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)04-0102-10

脂肪酸(fatty acid, FA)是鱼类生长必需的营养物质, 它具有重要的生理功能和作用^[1-2]。根据饱和度的不同, 脂肪酸可以分为饱和脂肪酸(saturated fatty acid, SFA)、单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acids, MUFA)和多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFA)。超长链饱和脂肪酸和超长链单不饱和脂肪酸是碳原子数超过 20 的饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸。这类脂肪酸大多是鞘脂的重要组分, 鞘脂是真核细胞膜的主要脂质成分, 在皮肤屏障形成和神经功能中起重要作用^[3-5]。

目前, 报道了 7 种脂肪酸延长酶(elongase of fatty acid 1-7, ELOVL1-7)^[3,6]。ELOVL1、ELOVL3 和 ELOVL6 参与 SFA 和 MUFA 的合成, 而 ELOVL2、ELOVL4 和 ELOVL5 参与 PUFA 合成^[6]。其中, ELOVL1 是延伸二十碳酸(20 : 0)、二十二碳酸(22 : 0)等超长链饱和脂肪酸和二十碳一烯酸(20 : 1)、二十二碳一烯酸(22 : 1)等超长链单不饱和脂肪酸的脂肪酸延长酶^[7-8]。先前的研究表明, ELOVL1 活性受神经酰胺合酶 2 (ceramide synthase 2, CERS2) 的调节, CERS2 是合成鞘脂所必需

的, ELOVL1 的延长产物二十四碳酸(24 : 0)是鞘脂重要组分^[3]。因此, ELOVL1 对于鞘脂合成很有必要。并且, 在哺乳动物中 *elovl1* 被证明是一个重要的基因参与皮肤脂质合成, 参与皮肤屏障作用的调控^[9-10]。*elovl1* 的敲降致使 22 : 0 延伸至二十六碳酸(26 : 0)的效率降低, 进而导致 X-连锁肾上腺白质营养不良(x-linked adrenoleukodystrophy, X-ALD)患者的成纤维细胞的 26 : 0 水平降低, 这暗示了 *elovl1* 对 X-ALD 具有一定的治疗潜力^[8]。虽然有研究表明 ELOVL1 在斑马鱼(*Danio rerio*) 肾器官发育过程中发挥着重要作用^[11], 但是 ELOVL1 在鱼类中的研究仍然很缺乏, 有待进一步探讨。

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*), 属于鲤形目、鳅科、泥鳅属, 是分布于各淡水水体中的一种野生小型鱼类, 适应性强, 抗病性好。目前, 泥鳅作为一种特种水产品畅销市场, 随着市场的需求量不断增加, 已成为我国水产养殖主要品种之一。

本研究在研究室前期工作的基础^[12]上, 利用 RT-PCR 和 RACE 方法克隆泥鳅的 *elovl1* 基因, 分

收稿日期: 2018-01-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31672660)

张义凤, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物营养与饲料, E-mail: 1769579647@qq.com

通信作者: 高 坚, 博士, 教授, 研究方向: 水产动物营养与饲料学, E-mail: gaojian@mail.hzau.edu.cn

析了 *elovl1* 基因的表达规律,及低温胁迫对泥鳅脂肪酸组成、组织形态及 *elovl1* 基因表达的影响。旨在为了解 ELOVL1 在鱼类中作用研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验鱼的饲养以及样品的收集

本试验所用泥鳅购买于武汉市白沙洲水产品市场,所有的试验用鱼均养殖在一个方形塑料养殖箱(容量为 500 L 内),投喂 2 周水蚯蚓(*Limnodrilus hoffmeisteri*)(水蚯蚓脂肪酸组成见表 1)进行驯化。驯化 2 周之后,选取 3 尾健康、体质量、规格基本一致的雌性成鱼泥鳅,取脑、鳃、心、眼、肝、脾、肠、肾、肌肉、皮肤和卵巢等组织,迅速投入液氮冷冻备用。另选取 3 尾泥鳅雄性成鱼取精巢组织,方法同上。低温试验按照上述方法选择泥鳅成鱼 120 尾,将试验鱼随机分成 2 组,即为常温组和低温组,每组 3 个重复,每个重复 20 尾。常温组试验鱼放养于室内养殖箱内,每天给予 12 h 的光照和 12 h 的黑暗处理,

表 1 水蚯蚓脂肪酸组成

Table 1 Lipid composition of water earthworm

脂肪酸种类 Fatty acid species	占总脂肪酸比例/ % Percentage
14 : 0	4.7±0.4
16 : 0	5.7±0.5
18 : 0	5.9±0.2
20 : 0	0.8±0.2
22 : 0	2.1±0.1
ΣSFA	19.3±0.4
16 : 1n-7	9.7±0.4
18 : 1n-9	11.0±0.4
20 : 1n-9	11.6±0.3
22 : 1n-9	1.0±0.2
22 : 1n-11	1.0±0.1
ΣMUFA	34.4±0.7
18 : 2n-6	8.7±0.5
20 : 2n-6	4.7±0.1
20 : 4n-6	10.1±0.4
Σn-6PUFA	23.5±0.7
18 : 3n-3	5.7±0.0
18 : 4n-3	1.0±0.0
20 : 4n-3	2.0±0.0
20 : 5n-3	8.3±0.4
22 : 5n-3	1.4±0.1
22 : 6n-3	0.3±0.1
Σn-3PUFA	18.9±0.1
n-3/n-6	0.8±0.0

表中数据为 3 个平行的平均值。Values represent mean±SD of three replicates.

使用加热棒维持常温 26 ℃,低温组放置于恒温箱内维持 8 ℃,并用温度计监测水温,pH 7.0~7.5、DO 约为 6.5 mg/L,试验期间不进行投喂。在试验进行 1 d、5 d 后分别从每箱随机取 1 尾泥鳅,用 100 mg/mL 的间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(鱼安定,MS-222)对泥鳅进行麻醉后取皮肤组织,30 d 后采取同样方法提取肝脏和皮肤组织,所取组织样品均委托武汉谷歌生物科技有限公司做油红 O 和苏木精-伊红(HE)染色切片。并且,在试验 30 d 后,分别从每个养殖箱随机取 3 尾泥鳅如上述提取肝脏和肌肉于冻存管中,将冻存管置于液氮罐中处理 8 h 之后转移到-80 ℃冰箱中保存备用,另取 3 尾鱼的肝脏组织于-20 ℃冰箱保存用以脂肪酸提取。

1.2 总 RNA 提取及反转录

取备用组织样品 50~80 mg,根据 RNA 提取试剂盒 RNAisoTM Plus(TaKaRa)操作说明书提取泥鳅各个组织样品总 RNA。根据反转录试剂盒 Primscript III Reverse transcriptase(TaKaRa)说明书,将所提取的样品总 RNA 反转录成模板第一链 cDNA,然后放置于-20 ℃冰箱保存备用。

1.3 泥鳅 *elovl1a*、*elovl1b* 基因克隆

通过笔者所在实验室的转录组数据获得泥鳅 *elovl1a*、*elovl1b* 基因的片段^[13],根据此片段序列,利用 Primer Premier 5.0 设计用于 5'-RACE 和 3'-RACE 的片段特异性引物,引物由武汉擎科生物科技有限公司合成,引物详情见表 2。然后通过 RACE 法克隆 *elovl1a*、*elovl1b* 全长 cDNA,按照 TaKaRa 公司的 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 的操作手册进行操作。根据测序结果,利用 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)剔除载体序列,利用 DNAMAN 软件将转录组获得的 *elovl1a*、*elovl1b* 核心序列和所获得的 3'和 5'区域拼接得到 *elovl1a*、*elovl1b* 全长序列。

1.4 *elovl1a*、*elovl1b* 基因的生物信息学分析

将 *elovl1a*、*elovl1b* 全长序列与 NCBI GenBank 中的已知序列做同源性分析,利用网站 ORF (Open reading frame) finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)寻找开放阅读框,利用 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)验证和翻译序列。将泥鳅 ELOVL1 与 GenBank 中已经报道过其他生物种类的 ELOVL1 在 BioEdit 软件上做多序列比对。利用软件 MEGA6.0 软件,采用

表 2 泥鳅 *elovl1* 基因克隆和表达引物

Table 2 Primers used in cloning and expression of *elovl1* from loach

用途 Aim	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
3'-RACE PCR 引物 Primers for 3'-RACE PCR	<i>elovl1a</i> -3'巢式 outer 引物 <i>elovl1a</i> -3' outer primer	AAATCGCAAACCATTCATCTCAACAC
	<i>elovl1a</i> -3'巢式 inner 引物 <i>elovl1a</i> -3' inner primer	TGGGAAAGTGAAGGAGGTCTAAACAGG
	<i>elovl1b</i> -3'巢式 outer 引物 <i>elovl1b</i> -3' outer primer	TCTTGATGTCAGGGTGGCTCACAGGAT
	<i>elovl1b</i> -3'巢式 inner 引物 <i>elovl1b</i> -3' inner primer	CTGGTGGAAGAAATACATGACTGCAAT
5'-RACE PCR 引物 Primers for 5'-RACE PCR	<i>elovl1a</i> -5'巢式 outer 引物 <i>elovl1a</i> -5' outer primer	AGATGGATGAAAATGGGAACCTGGTAG
	<i>elovl1a</i> -5'巢式 inner 引物 <i>elovl1a</i> -5' inner primer	CTCTCTAATACAGTCACTCCAGCCAAA
	<i>elovl1b</i> -5'巢式 outer 引物 <i>elovl1b</i> -5' outer primer	GAAGAGTATGAAGAAGAAGGTCCCGTA
	<i>elovl1b</i> -5'巢式 inner 引物 <i>elovl1b</i> -5' inner primer	TTCACTCGTGGGTCTCTTCTGCTAAA
RT-PCR/qRT-PCR 引物 Primers for RT-PCR/qRT-PCR	<i>β-actin</i> 上游引物 <i>β-actin</i> -F primer	TTACCCACACCGTGCCCATCTAC
	<i>β-actin</i> 下游引物 <i>β-actin</i> -R primer	TACCGCAAGACTCCATACCCA
	<i>elovl1a</i> -RT 上游引物 <i>elovl1a</i> -RT-F primer	TTGCCTACAATGCCTACAT
	<i>elovl1a</i> -RT 下游引物 <i>elovl1a</i> -RT-R primer	CCAACAGGAGTAAGAGTGAT
	<i>elovl1b</i> -RT 上游引物 <i>elovl1b</i> -RT-F primer	CTGGTTGCCTTGTCTGTAT
	<i>elovl1b</i> -RT 下游引物 <i>elovl1b</i> -RT-R primer	GGAATGATGGAAGATGTGTAG

临位相连(neighbor-joining, NJ)法构建进化树。氨基酸等电点、分子质量等参数利用 Protparam 程序(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行预测^[14]。使用 TMHMM Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)分析跨膜结构^[15]。

1.5 *elovl1a*、*elovl1b* 基因在泥鳅不同组织中的表达分析

采用 RT-PCR 方法检测 *elovl1a*、*elovl1b* 基因在泥鳅脑、鳃、心、眼、肝、脾、肠、肾、肌肉、皮肤、精巢和卵巢等 12 个组织中的表达情况。选用 *β-actin* 作为内参对照基因,其 PCR 反应体系总 20 μL,各组分如下:2×TSINGKE Master Mix,10 μL;去离子水,7 μL;上游引物,1 μL;下游引物,1 μL;模板,

1 μL。反应程序:98 ℃预变性 5 min,98 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃下延伸 30 s,35 个循环后,72 ℃最后延伸 5 min。所用引物序列见表 2。

1.6 提取脂肪酸及 GC-MS 分析脂肪酸种类

取备用样品 10 mg,在含有 0.01% BHT(抗氧化剂)的氯仿/甲醇(2:1, V/V)混合液中匀浆提取总脂质^[16],根据 Christie^[17]描述的方法进行纯化。使用与 MD800 质谱仪偶联的气相色谱仪(GC8000)鉴定和定量脂肪酸甲基酯种类。注射口和检测器的温度设定为 230 ℃,以 40 ℃/min 的速度从 80 ℃升高到 230 ℃,在 230 ℃下保留 19 min。每种脂肪酸含量计算公式为:该种脂肪酸出峰面积/总脂肪出峰面积×100^[18]。

1.7 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

qRT-PCR 分析参照 Zhang 等^[13]的方法,即按照 SYBR Green I fluorescence kit 试剂盒(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)在 Mini Opticon real-time detector 分析检测仪(BIO-RAD, Hercules, CA, USA)上以 β -actin 为内参基因,以 *elovl1a* 和 *elovl1b* 的反转录产物为模板进行 qRT-PCR 分析,每个样品做 3 个重复。反应为 20 μ L 体系:SYBR © Green Real-time PCR Master Mix 10 μ L, cDNA 模板 5 μ L,上下游引物各 1 μ L,去离子水 3 μ L。反应程序设置为:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算每条基因的相对表达水平。所用引物序列见表 2。

1.8 数据分析

试验数据采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)统计分析,用 Duncan's 多重比较来确定各试验组间差异的显著性。显著水平为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 *elovl1a*、*elovl1b* 基因全序列分析

泥鳅的 *elovl1* 基因包括 *elovl1a* (GenBank 登录号:MG725966.1)和 *elovl1b* (GenBank 登录号:MG725967.1)。*elovl1a* 基因全长为 2 216 bp,开放阅读框(ORF)为 948 bp,编码 315 个氨基酸,5'端的非编码区(untranslated region, UTR)为 463 bp,3'UTR 为 805 bp。*elovl1b* 基因全长为 1 895 bp,ORF 为 963 bp,编码 320 个氨基酸,5'UTR 为 268 bp,3'UTR 为 664 bp。泥鳅 ELOVL1A 和 ELOVL1B 的氨基酸序列都含有高度保守的氧化还原中心组氨酸簇(HXXHH),氨基酸序列 C 端均含有内质网滞留信号(KXKXX),预测具有 7 个跨膜结构域(图 1A)。泥鳅 ELOVL1A、ELOVL1B 氨基酸序列分子质量分别为 37.02、37.28 ku,等电点分别为 9.37、9.52。序列比对(图 1B)表明:人类(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、斑马鱼和泥鳅 ELOVL1 氨基酸序列差异主要集中在 C 端的多肽序列上。尤其,泥鳅和斑马鱼的 ELOVL1A 和 ELOVL1B 的 C 端区域含有更多的氨基酸,与人类和小鼠有着显著的不同。结果表明,泥鳅的 ELOVL1 与人类和小鼠的同源性较低,其 ELOVL1A 与人类和小鼠的同源性分别为 64%、63%,其 ELOVL1B 与人类和小鼠的同源性分别为

69%、67%,ELOVL1B 与人类和小鼠的同源性较 ELOVL1A 更高。但是,序列比对结果显示中部区域同源性较高,包含 5 个高度保守区域,具有相同的脂肪酸延伸所必需的脂肪酸去饱和酶序列,意味着 ELOVL1 在脊椎动物中是保守的。而且,泥鳅和斑马鱼同属于鲤形目鱼类,二者之间的 ELOVL1A 和 ELOVL1B 同源性分别为 86%、84%,表现出较高的一致性。

2.2 ELOVL1A、ELOVL1B 系统进化分析

基于泥鳅、其他淡水鱼类和海水鱼类以及哺乳动物的 ELOVL1 的氨基酸序列构建进化树(图 2)。所选择的氨基酸序列包括斑马鱼 ELOVL1A、ELOVL1B;鲤(*Cyprinus carpio*) ELOVL1A、ELOVL1B;墨西哥脂鲤(*Astyanax mexicanus*) ELOVL1A;大西洋鳕(*Gadus morhua*) ELOVL1A、ELOVL1B;金头鲷(*Sparus aurata*) ELOVL1B;鲈(*Dicentrarchus labrax*) ELOVL1B;人类 ELOVL1;小鼠 ELOVL1;山羊(*Capra hircus*) ELOVL1。从图 2 中可以看出,泥鳅的 ELOVL1A、ELOVL1B 与斑马鱼和鲤共聚于一个进化分支,亲缘关系最近,与海水鱼类较远,与哺乳动物最远。另外,鱼类的 ELOVL1B 与哺乳动物 ELOVL1 的亲缘关系较 ELOVL1A 更近。

2.3 泥鳅 *elovl1a*、*elovl1b* mRNAs 组织表达分析

泥鳅 *elovl1a* 和 *elovl1b* 在所有组织中表达,*elovl1a* 在卵巢中表达较高,其他组织的表达量均明显低于卵巢的表达量。*elovl1b* 转录水平在卵巢、脑、肾、脾脏和肠道中均较高,其次是鳃、心脏、肝脏、皮肤和肌肉,在眼睛和精巢表达量最低。此外,*elovl1a* 在所有组织中的表达量均低于 *elovl1b*,如图 3 显示。

2.4 组织切片染色和脂肪酸组成分析

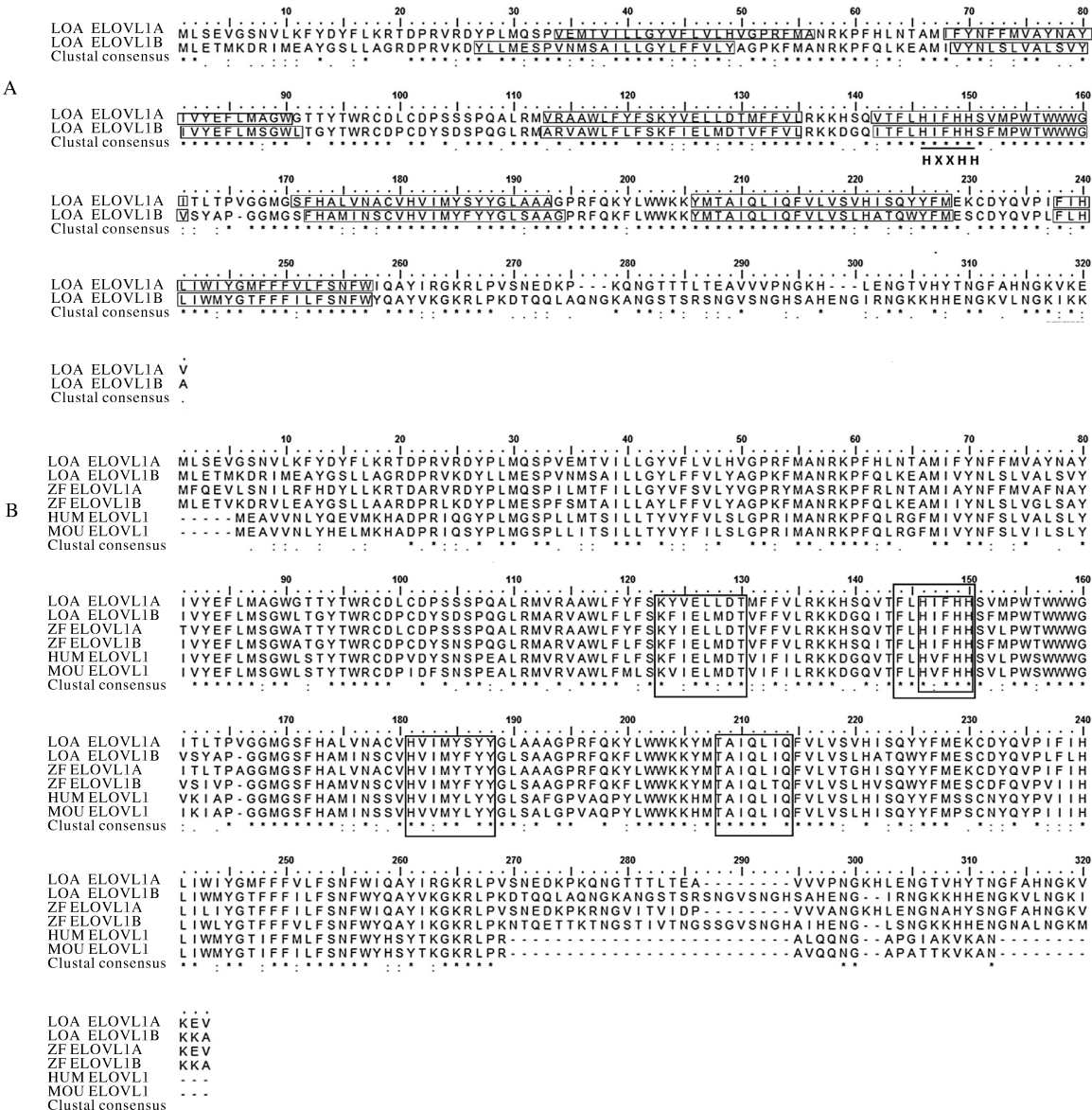
如图 4A 所示,与对照组(26 °C 饲养的泥鳅)相比,试验组(8 °C 下喂养的泥鳅)肝组织 HE 染色切片显示其存在明显的气泡部分,表明肝组织受到了损伤(箭头所指部分)。该组织油红 O 染色结果表明低温胁迫下的泥鳅,肝脏中有明显的脂肪滴积累现象,如图 4B。试验组与对照组肝脏脂肪酸组成存在明显的差异,由图 4C 可以看出,低温下泥鳅肝中总 SFA 明显降低($P<0.05$),而其中 16:0 降低,22:0 升高,总 MUFA 显著增加($P<0.05$),其中二十二碳一烯酸(22:1n-9、22:1n-11)显著增加($P<0.05$)。试验组真皮下有明显的增生现象

(5A),其脂肪较对照组也有明显的积累(5B)。

2.5 低温胁迫下 *elovl1a*、*elovl1b* 的表达分析

如图 6 所示: 试验组泥鳅肌肉和肝组织 *elovl1a*、*elovl1b* 的表达水平与对照组有着显著的

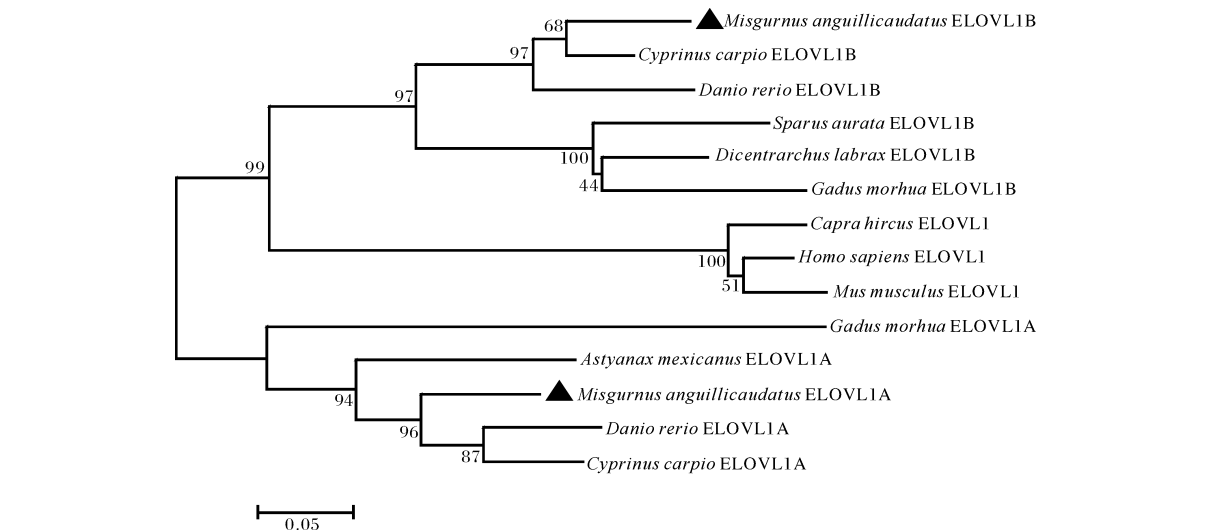
变化。并且,两者变化趋势存在着明显的区别,在肝脏中 *elovl1a* 和 *elovl1b* 均显著地被诱导表达,但是 *elovl1a* 增加的幅度明显大于 *elovl1b*;在肌肉中 *elovl1b* 的表达水平显著增加,而 *elovl1a* 几乎没有变化。



A:泥鳅 ELOVL1A、ELOVL1B 推测的氨基酸序列。A:Deduced amino acid sequences of ELOVL1A and ELOVL1B of loach.LOA,泥鳅 Loach。“□”表示 7 个跨膜区,“—”表示高保守氧化中心,“.....”表示内质网滞留信号。“□” stand for 7 transmembrane regions,“—” stand for high conservative oxidation centers,“.....” stand for the putative endoplasmic reticulum retrieval signal.B:泥鳅 ELOVL1A、ELOVL1B 氨基酸序列与其他物种氨基酸序列比对。B:Protein sequence alignment of ELOVL1A and ELOVL1B from loach and other species.ZF,斑马鱼 Zebrafish; HUM,人类 Human; MOU,小鼠 Mouse。‘*’与‘:’分别表示氨基酸残基相同和相似,5 个延长酶家族保守序列用实线框表示。Identical and similar residues are marked with ‘*’ and ‘:’ respectively,5 conserved motifs in ELOVL family members are boxed.斑马鱼 ELOVL1A(NP_001005989.1),ELOVL1B(NP_001315523.1);人类 ELOVL1(EAX07100.1);小鼠 ELOVL1(NP_062295.1)。Zebrafish ELOVL1A (NP_001005989.1),ELOVL1B (NP_001315523.1); Human ELOVL1 (EAX07100.1); Mouse ELOVL1 (NP_062295.1)。

图 1 泥鳅 ELOVL1A、ELOVL1B 氨基酸序列分析

Fig.1 The analysis of amino acid sequences of ELOVL1A and ELOVL1B in loach



分支上数字表示统计 1 000 次后进化树呈现的概率。The numbers represented the frequencies (%) with the tree topology presented after 1 000 iterations. 鲤 ELOVL1A(KTG45954.1)、ELOVL1B(KTG37167.1)；墨西哥脂鲤 ELOVL1A(XP_007257881.1)；大西洋鳕 ELOVL1A(AIG21326.1)、ELOVL1B(AIG21327.1)；金头鲷 ELOVL1B(AGV13272.1)；鲈 ELOVL1B(AIT82973.1)；山羊 ELOVL1 (AHA82506.1)。Carp ELOVL1A (KTG45954.1),ELOVL1B (KTG37167.1)；Mexican tetra ELOVL1A (XP_007257881.1)；Atlantic cod ELOVL1A (AIG21326.1),ELOVL1B (AIG21327.1)；Gilthead seabream ELOVL1B (AGV13272.1)；Bass ELOVL1B (AIT82973.1)；Goat ELOVL1 (AHA82506.1)。

图 2 泥鳅 ELOVL1A、ELOVL1B 系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of the amino acid sequences of ELOVL1A and ELOVL1B from *Misgurnus anguillicaudatus* and other species



图 3 泥鳅 *elovl1a*, *elovl1b* 不同组织相对表达水平
Fig.3 Relative expression levels of two *elovl1* isoforms, *elovl1a* and *elovl1b* in different tissues in *Misgurnus anguillicaudatus*

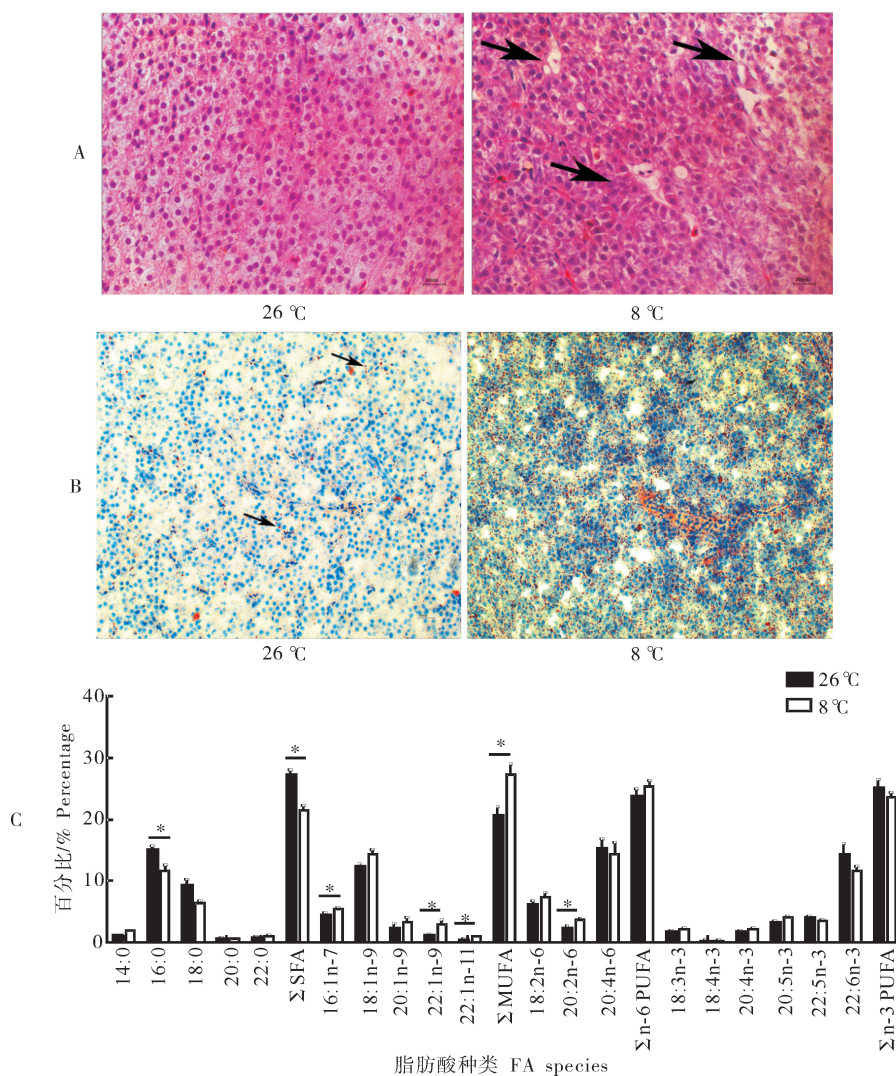
3 讨 论

本试验克隆了泥鳅 *elovl1* 基因全长序列。分析 ELOVL1A、ELOVL1B 氨基酸序列可知，高保守的氧化还原中心位于第 4 个跨膜区内(图 1A)，而所报道的 ELOVL4 该结构位于第 2 个跨膜区与第 3 个跨膜区之间^[19]，ELOVL5 位于第 2 跨膜区内^[20]，ELOVL6 位于第 3 跨膜区内^[15]，该保守结构在延长酶家族中均存在，可能参与酶活性的调控。ELOVL1A 和 ELOVL1B 氨基酸序列 C 端均含有内质网滞留信号(KXKXX)，该结构是延长酶家族

典型的保守结构^[19]。序列比对同源性分析表明：泥鳅与斑马鱼二者之间的 ELOVL1A 和 ELOVL1B 同源性最高，其 ELOVL1A 和 ELOVL1B 与人类和小鼠的 ELOVL1 主要区别在于泥鳅和斑马鱼的 ELOVL1A 和 ELOVL1B 的 C 端区域含有更多的氨基酸(图 1B)。这可能是导致鱼类 ELOVL1 与哺乳动物 ELOVL1 同源性较低的主要原因，从而致使在作用机制上存在差别。而且在人类和小鼠中 *elovl1* 基因只有 1 条，在鲤、斑马鱼以及本研究的泥鳅等鱼类中发现 *elovl1* 基因包括 *elovl1a*、*elovl1b*。如图 3 所示，鱼类和哺乳动物 ELOVL1 氨基酸序列中部区域同源性较高，脂肪酸延伸所必需的脂肪酸去饱和酶序列高度保守，表明 ELOVL1 在脊椎动物中是保守的，推测 ELOVL1 的功能作用在脊椎动物中具有保守性，ELOVL1A、ELOVL1B 在鱼类中的功能类似于哺乳动物，主要延伸 SFA 和 MUFA。

泥鳅的 ELOVL1A、ELOVL1B 与斑马鱼和鲤共聚于一进化分支，亲缘关系最近，与海水鱼类较远，与人类和小鼠等代表的哺乳动物的亲缘关系最远(图 2)。这与序列比对的结果一致，符合分子生物学进化论，说明延长酶的进化受到环境一定的影

响。另外,从该进化分析图可以看出,鱼类的 ELOVL1B 与哺乳动物 ELOVL1 的亲缘关系较 ELOVL1A 更近,表明鱼类 ELOVL1B 作用机制较 ELOVL1A 更加类似于哺乳动物的 ELOVL1。

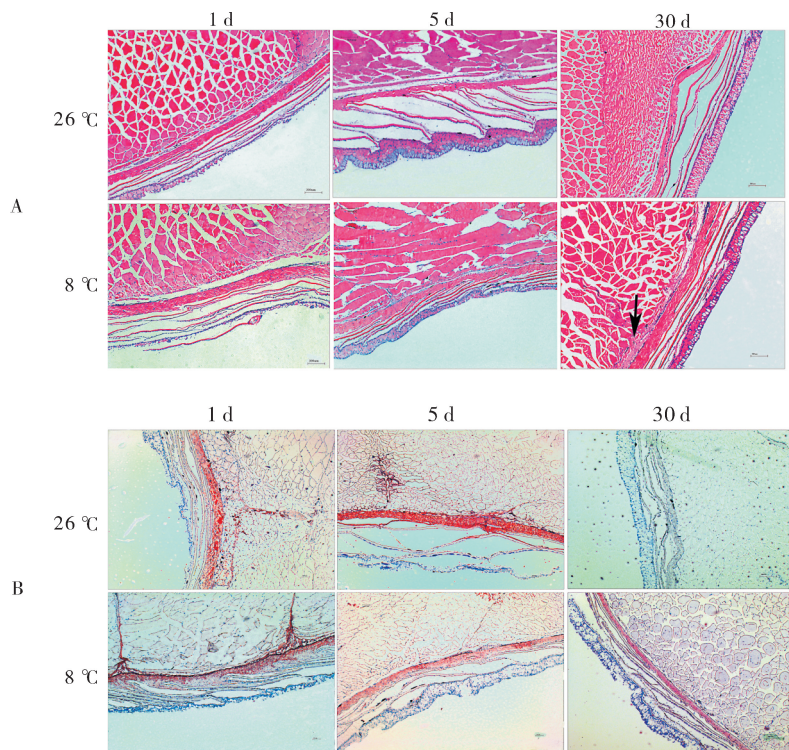


A:26 °C 和 8 °C 下喂养 30 d 的泥鳅肝组织的 HE 染色切片(箭头为肝组织损伤位置) HE staining of the liver tissue from loach reared at 26 °C and 8 °C for 30 d (the arrows showed where liver tissue was damaged);B:26 °C 和 8 °C 下喂养 30 d 的泥鳅肝组织的油红 O 染色切片(箭头为脂肪滴位置,8 °C 下肝组织中明显布满了红色的脂肪滴) Oil red O staining of liver tissue from loach reared 26 °C and 8 °C for 30 d,in which the red points showed where the fat deposited (the arrows showed where fatty acids were,the liver tissue in 8 °C group was filled with fatty acids); C:26 °C 和 8 °C 下喂养 30 d 的泥鳅肝组织的脂肪酸组成 The FA composition of the liver tissue from loach reared at 26 °C and 8 °C for 30 d.“ * ”表示有显著差异($P<0.05$)。 Data with an asterisk stands for a significant difference ($P<0.05$).

图 4 在 26 °C 和 8 °C 下喂养 30 d 的泥鳅的肝组织的脂质沉淀以及脂肪酸组成变化

Fig.4 Fat deposit and composition of fatty acids of liver tissue in loach reared at 26 °C and 8 °C for 30 d

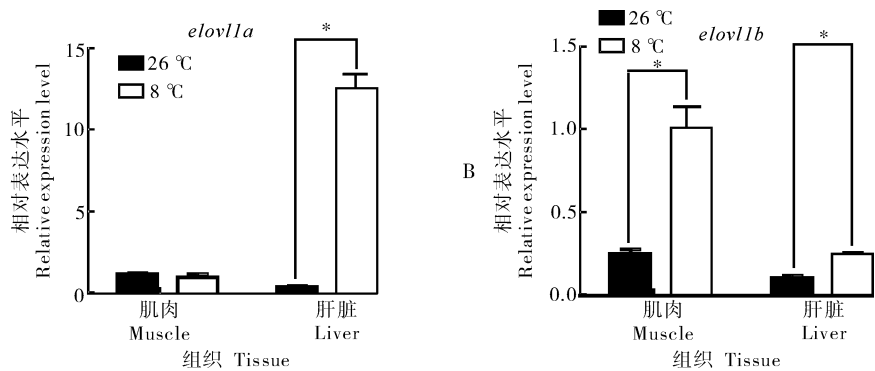
elovl1a、*elovl1b* 全身表达且具有组织表达特异性(图 3),这暗示在不同组织中其参与脂肪代谢程度不同。根据上述可知,鱼类 ELOVL1B 与哺乳动物的同源性较 ELOVL1A 高,ELOVL1B 与哺乳动物的亲缘关系较 ELOVL1A 更近,而从不同组织半定量图不难看出在所有组织中 *elovl1b* 的表达量较 *elovl1a* 高,所以我们可以推测鱼类中的 ELOVL1B 功能作用较 ELOVL1A 更加接近哺乳动物的 ELOVL1,甚至在鱼类中是 ELOVL1B 发挥重要作用。*elovl1a*、*elovl1b* 在卵巢中表达量最高,尤其对于 *elovl1a*,其他组织的表达量均明显低于卵巢的表达量,推测 ELOVL1 在卵巢中可能参与其重



A:在 26 °C 和 8 °C 下喂养 1 d、5 d、30 d 的泥鳅的皮肤组织的 HE 染色切片(箭头所指为皮下组织增生位置) HE staining of the muscle tissue from loach reared at 26 °C and 8 °C for 1 d、5 d and 30 d (the arrows showed the tissue hyperplasia) ; B:在 26 °C 和 8 °C 下喂养 1 d、5 d、30 d 的泥鳅的皮肤组织的油红 O 染色切片(红色为脂肪积累位置) Oil red O staining of muscle tissue from loach reared 26 °C and 8 °C for 1 d、5 d and 30 d,in which the red points showed where the fat deposited.

图 5 在 26 °C 和 8 °C 下喂养 1 d、5 d、30 d 的泥鳅的皮肤组织的脂质沉淀

Fig.5 Fat deposit of fatty acids of muscle tissue in loach reared at 26 °C and 8 °C for 1 d、5 d and 30 d



“*”表示有显著差异($P<0.05$)。Data with an asterisk stands for a significant difference ($P<0.05$).

图 6 在 26 °C 和 8 °C 下喂养 30 d 的泥鳅的肝和肌肉中 *elovl1a* (A)、*elovl1b* (B) 基因的表达水平

Fig.6 Expression levels of *elovl1a* (A), *elovl1b* (B) in muscle and liver tissues from loach reared at 26 °C and 8 °C for 30 d

要脂类的合成。*elovl1b* 在脑中表达量很高,可能参与中枢神经系统的髓磷脂的形成。在肠、肾和脾脏中 *elovl1b* 的转录水平高,暗示着 ELOVL1B 可能参与其重要组织的生长发育。*elovl1b* 在肝中表达量较高,意味着参与其脂肪酸代谢调控。此外,在泥鳅的皮肤组织中 *elovl1b* 也有明显的表达,影响着皮肤屏障作用。

变温动物因为其生理代谢较慢,所以体温随环境温度的变化而变化,低温环境会极大地影响生物体生理反应,脂肪酸代谢调控受到影响,组织功能受到损伤。如图 4A 所示,试验组泥鳅肝组织 HE 染色显示肝组织出现了损伤。并且,油红 O 染色结果进一步表明低温下的泥鳅肝脏中有明显的脂肪滴积累现象,如图 4B。肝组织是脂肪酸代谢调控中心,

低温下,机体生理反应受到限制,脂肪酸代谢紊乱,脂肪酸得不到有效利用而发生脂质积累。研究证明皮肤脂质的变化影响着皮肤的正常功能^[9-10]。在试验 30 d 后,试验组真皮下有明显的增生(5A),其脂肪较对照组也有明显的积累(5B),暗示低温胁迫 30 d 泥鳅的皮肤损伤,皮肤功能可能受到影响。研究证明,增加细胞膜不饱和脂肪酸比例来增加膜流动性有助于变温脊椎动物在低温胁迫下保持生理稳态^[21-23]。本研究发现,低温下喂养 30 d 的泥鳅肝中总 SFA 明显降低($P < 0.05$),总 MUFA 显著增加($P < 0.05$)。Hsieh 等^[24] 早前研究得出遮目鱼(*Chanos chano*)在低温下单不饱和脂肪酸显著增加,本研究结果与此相符。水蚯蚓脂肪酸组成测定结果表明二十碳四烯酸(20:4n-6)的含量偏高,试验组和对照组的肝脏中 20:4n-6 含量均较高,可能与驯养阶段以水蚯蚓为食有关。

泥鳅为适应低温环境,其肌肉和肝脏组织 *elovl1a*, *elovl1b* 的表达水平有着显著增高现象。上述中试验组肝组织 16:0 降低,22:0 升高,22:1n-9 和 22:1n-11 显著增加($P < 0.05$),这与 *elovl1a*, *elovl1b* 的表达水平的增加相一致。早前 *elovl1* 被证明在低温下会被显著地诱导表达以调节机体产热适应低温环境^[25]。本研究 *elovl1a*, *elovl1b* 被诱导表达,其表达量的显著增加推测是为调节组织超长链饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸含量来适应低温环境而发生的反应。从图 6 中我们还可以发现两者变化趋势存在着明显的区别,在肝脏和肌肉中 *elovl1b* 均显著地被诱导表达,*elovl1a* 主要在肝脏表达量显著,在肌肉中其表达几乎没有变化,表明在鱼类中 ELOVL1A、ELOVL1B 功能存在区别,ELOVL1B 可能发挥更重要的作用。

本研究克隆出泥鳅的 *elovl1a* 和 *elovl1b* 基因,*elovl1a* 和 *elovl1b* 均为全身表达基因且具有组织表达特异性,但在各个组织中 *elovl1b* 表达量均高于 *elovl1a*,ELOVL1B 与哺乳动物的亲缘关系更近,在鱼类中 ELOVL1B 的功能作用可能更类似于哺乳动物的 ELOVL1,推测 ELOVL1B 可能在鱼体内发挥着关键作用。低温下,*elovl1a* 和 *elovl1b* 均被诱导表达参与机体低温适应性反应。

参 考 文 献

- [1] SARGENT J R, BELL J G, MCEVOY L, et al. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish[J]. *Aquaculture*, 1999, 177: 191-199.
- [2] 唐传核, 徐建祥, 彭志英. 脂肪酸营养与功能的最新研究[J]. *中国油脂*, 2000, 25(6): 20-23.
- [3] OHNO Y, SUTO S, YAMANAKA M, et al. ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2010, 107(43): 18439-18444.
- [4] MIZUTANI Y, MITSUTAKE S, TSUJI K, et al. Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function[J]. *Biochimie*, 2009, 91(6): 784-790.
- [5] IMGRUND S, HARTMANN D, FARWANAH H, et al. Adult ceramide synthase 2 (CerS2) deficient mice exhibit myelin sheath defects, cerebellar degeneration and hepatocarcinomas[J]. *The journal of biological chemistry*, 2009, 284(48): 33549-33560.
- [6] JAKOBSSON A, WESTERBERG R, JACOBSSON A. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism[J]. *Progress in lipid research*, 2006, 45(3): 237-249.
- [7] SASSA T, OHNO Y, SUZUKI S, et al. Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking *elovl1*, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production[J]. *Molecular and cellular biology*[J], 2013, 33(14): 2787-2796.
- [8] ROB O, INGE M E, CARLO W T, et al. The role of ELOVL1 in very long-chain fatty acid homeostasis and X-linked adrenoleukodystrophy[J]. *EMBO molecular medicine*, 2010, 2(3): 90-97.
- [9] DANSO M O, BOITENA W, DRONGELENA V V, et al. Altered expression of epidermal lipid bio-synthesis enzymes in atopic dermatitis skin is accompanied by changes in stratum corneum lipid composition[J]. *Journal of dermatological science*, 2017, 88(1): 57-66.
- [10] HIRABAYASHI T, ANJO T, KANEKO A, et al. PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis[J]. *Nature communications*, 2017, 8: 1-10.
- [11] BHANDARI S, LEE J N, KIM Y, et al. The fatty acid chain elongase, Elov1, is required for kidney and swim bladder development during zebrafish embryogenesis[J]. *Organogenesis*, 2016, 12(2): 78-93.
- [12] 燕杰, 文永辉, 王卫民, 等. 饲料不同蛋白源对泥鳅稚鱼生长性能、体氨基酸组成和抗氧化性能的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2016, 35(3): 101-107.
- [13] ZHANG Y, LI Y, LIANG X, et al. Hepatic transcriptome analysis and identification of differentially expressed genes response to dietary oxidized fish oil in loach *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(2): e0172386.
- [14] LIANG X, GAO J, LI D P, et al. Cloning and expressions of peroxisome proliferator activated receptor $\alpha 1$ and $\alpha 2$ (PPAR $\alpha 1$ and PPAR $\alpha 2$) in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) and in response to different dietary fatty acids[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2016, 481(1/2): 38-45.
- [15] 施秋燕, 杨志刚, 姚琴琴, 等. 中华绒螯 ELOVL6 cDNA 全长克隆及其表达分析[J]. *水产学报*, 2016, 40(6): 844-855.
- [16] FOLCH J, LEES M, SLOANE-STANLEY G H, et al. A simple

- method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues[J]. Biological chemistry, 1957, 226(1): 497-509.
- [17] CHRISTIE W W. Lipid analysis[M]. Oxford: Pergamon press, 1973.
- [18] YAN J, LIANG X, CUI Y, et al. *Elovl4* can effectively elongate C18 polyunsaturated fatty acids in loach *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2018, 495(4): 2637-2642.
- [19] MONROIG Ó, ROTLLANT J, CERDÁ-REVERTE J M, et al. Expression and role of *Elovl4* elongases in biosynthesis of very long-chain fatty acids during zebrafish *Danio rerio* early embryonic development[J]. Biochimica et biophysica acta, 2010, 1801(10): 1145-1154.
- [20] 吴景, 郑先虎, 匡友谊, 等. 镜鲤脂肪酸延长酶 5 基因的克隆和表达分析[J]. 中国水产科学, 2015, 22(1): 9-16.
- [21] WODTKE E, COSSINS A R. Rapid cold-induced changes of membrane order and activity in endoplasmic reticulum of carp liver: a time-course study of thermal acclimation[J]. Biochimica et biophysica acta, 1991, 1064(2): 343-350.
- [22] TIKU P E, GRACEY A Y, MACARTNEY A I, et al. Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms [J]. Science, 1996, 271(5250): 815-818.
- [23] TRUEMAN R J, TIKU P E, CADDICK M X, et al. Thermal thresholds of lipid restructuring and delta 9-desaturase expression in the liver of carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. The Journal of experimental biology, 2000, 203(3): 641-650.
- [24] HSIEH S L, KUOB C M. Stearoyl-CoA desaturase expression and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during cold acclimation [J]. Comparative biochemistry and physiology part b: biochemistry and molecular biology, 2005, 141(1): 95-101.
- [25] SUZUKI S, AWAI K, ISHIHARA A, et al. Cold temperature blocks thyroid hormone-induced changes in lipid and energy metabolism in the liver of *Lithobates catesbeianus* tadpoles[J]. Cell & bioscience, 2016, 6: 1-16.

Cloning and characteristic analysis of *elovl1* genes from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) and its role in adaptation to cold temperature

ZHANG Yifeng WANG Liwei CAO Xiaojuan GAO Jian

College of Fisheries/Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics

Breeding and Reproduction, Ministry of Education/Key Lab of Freshwater Animal Breeding,
Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract This trial was conducted to investigate the role of the *elovl1* gene from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). The loach *elovl1* was cloned by using RT-PCR and RACE, and its expression patterns were analyzed. The loach were exposed to 8 °C and 26 °C for 30 d to evaluate the effects of cold stress on fatty acid composition, tissue morphology and expression of the *elovl1* gene. The results showed that the *elovl1a* full-length cDNA was 2 216 bp with an ORF of 948 bp, encoding 315 amino acids and the *elovl1b* full-length cDNA was 1 895 bp with an ORF of 963 bp, encoding 320 amino acids. The *elovl1* protein was conserved in vertebrates, containing one conserved diagnostic histidine box HXXHH motif, several transmembrane regions, and the endoplasmic reticulum retrieval signal (KXXXX) at the carboxyl terminus. The *elovl1a* and *elovl1b* were expressed in almost all tissues and the expression of *elovl1a* was lower than that of *elovl1b* in every tissue tested. Total saturated fatty acids (SFA) significantly decreased ($P < 0.05$), and total monounsaturated fatty acids (MUFA) significantly increased in the liver at 8 °C compared to that at 26 °C ($P < 0.05$). Both *elovl1a* and *elovl1b* were significantly induced in the muscle and liver ($P < 0.05$) after exposed to cold. In conclusion, *elovl1* was conserved in vertebrates, which might involve in energy production and play an important role in adaptation to cold temperature.

Keywords *Misgurnus anguillicaudatus*; elongase of long-chain fatty acid 1; gene cloning; cold stress; fatty acid composition