

杨莉, 齐亚银, 张莉, 等. 阿勒泰羊脂肪酸合成酶及脂蛋白酯酶基因的序列分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 43–45.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.011

# 阿勒泰羊脂肪酸合成酶及脂蛋白酯酶基因的序列分析

杨莉<sup>1</sup>, 齐亚银<sup>1</sup>, 张莉<sup>1</sup>, 李岩<sup>2</sup>, 张鲁安<sup>2</sup>

(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832000; 2. 新疆生产建设兵团畜牧兽医工作总站, 新疆乌鲁木齐 830063)

**摘要:**以阿勒泰羊为研究对象, 对脂肪酸合成酶(FAS)基因、脂蛋白酯酶(LPL)部分编码区的 cDNA 进行克隆、测序, 与 GenBank 中已收录的其他 11 种动物的 FAS/LPL 基因序列进行同源性分析, 并构建分子进化树。结果显示, 所克隆的 FAS/LPL 基因与绵羊的基因序列同源性最高, 分别为 99.61%、100.00%; FAS 基因与虎鲸同源性最低, 为 46.24%; LPL 基因与罗非鱼的序列同源性最低, 为 56.28%。结果均正确地反映了物种间的进化关系, 序列分析结果为人们进一步对阿勒泰羊脂肪的相关研究、肉质性状的研究及育种提供了理论基础, 同时也为阿勒泰羊 FAS/LPL 基因的生物学功能、遗传进化研究提供了分子依据。

**关键词:**硬脂酰辅酶 A 去饱和酶; 脂肪酸合成酶; 脂蛋白酯酶; 序列分析; 阿勒泰羊

**中图分类号:** S811.3; Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0043-03

新疆阿勒泰地区位于中国西北边陲, 冬季长达半年, 许多优良绵羊品种无法适应阿勒泰地区异常寒冷的气候条件, 而阿勒泰羊以其全身肌肉丰满、体型肥硕、尾根附近沉积大量脂肪、耐粗饲、抗寒性强等特点, 能够适应阿勒泰地区异常寒冷的气候条件, 成为当地的优良类群<sup>[1]</sup>。脂肪酸的合成是由脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)催化乙酰辅酶 A 和丙二酸单酰辅酶 A 合成甘油三酯(TAG)<sup>[2]</sup>, FAS 表达水平的高低能够直接影响甘油三酯在体内的沉积<sup>[3]</sup>, 因此 FAS 是脂肪酸合成代谢的关键酶。Hsu 等分离得到人脂肪酸合成酶代谢调控基因, 发现人的脂肪酸合成酶基因位于 17q25<sup>[4]</sup>。Kameda 等对鹅脂肪酸合成酶代谢调控基因作了研究, 发现脂肪酸合成酶代谢调控基因全序列长度大约有 50 kb, 同时现已知牛的基因位于 19q22、鸡的基因位于 18 号染色体上<sup>[5]</sup>。脂蛋白酯酶(lipoprotein lipase, LPL)是机体脂质和脂蛋白代谢的关键酶, 是分解循环脂蛋白中乳糜微粒和极低密度脂蛋白中的甘油三酯, 释放出脂肪酸和甘油的限速酶<sup>[6]</sup>, 作为影响脂肪沉积的一个重要遗传标记, 研究 LPL 表达水平对加快肉品质改进速度具有重要的意义。本研究对阿勒泰羊的 FAS、LPL 基因部分片段进行了克隆、测序, 并与已报道的其他物种的相应基因进行序列分析, 以期在分子水平的基础上为家畜的改良育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

选择新疆福海县 5 只健康成年的阿勒泰羊, 采集阿勒泰

羊颈部肌间脂肪、胸部肌间脂肪、腹部肌间脂肪、腿部肌间脂肪、尾部脂肪、肝脏等 6 个部位的组织, 立即放入液氮罐速冻, 转入 -80 ℃冰箱中保存。

TRIzol、DEPC、DNA marker、Taq PCR Master Mix, 购自天根生物科技服务有限公司; PrimeScript® RT reagent kit 反转录试剂盒(批号: RR047A), 购自 TaKaRa 公司(批号: DRR420A); DNA 凝胶回收试剂盒(批号: DP209-02)、胰蛋白胨、琼脂粉、琼脂糖、三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇, 购自北京华美生物工程公司; 感受态细胞 *E. coli* DH5α 由石河子大学动物科技学院传染病实验室保存。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 目的基因引物设计** 以 GenBank 中已发布的绵羊 FAS 基因(登录号: NM\_001009254.1)、LPL 基因(登录号: NM\_001009394.1)为模板, 用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 由北京六合华大基因有限公司合成。FAS 基因上游引物: 5'-CCTCGGTGCCCCGTGTCTAC-3'; 下游引物: 5'-TGCTGCTCAAAGGATGTGTC-3'; 目的片段长度为 256 bp。LPL 基因上游引物: 5'-GATTAGCGATTCTACTTCAGC-3'; 下游引物: 5'-AGACTTGTCTATGGCATTTTCAC-3'; 目的片段长度为 181 bp。

**1.2.2 RNA 的提取** 利用 TRIzol 一步法提取试验样品的总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量, 于 -70 ℃保存备用。然后依次加入以下试剂: 1 μg RNA、10 × Reaction buffer、1 μL MgCl<sub>2</sub>、1 μL DNase I (RNase-free), 用 DEPC 处理水补足至 10 μL, 除去存在的少量基因组 DNA。于 37 ℃反应 30 min, 然后加入 1 μL 50 mol/L EDTA, 65 ℃孵化 10 min, 即可用此 RNA 作为反转录模板。以 RNase-free 水为对照, 用紫外分光光度计测定  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值、总 RNA 浓度。

**1.2.3 反转录** 向提取纯化好的各组织的总 RNA 中加入以下试剂: 2 μL 5 × gDNA Eraser buffer I、1 μL 5 × gDNA Eraser I、1 μL 总 RNA, 用无核酸酶水补足至 10 μL。然后于 42 ℃孵育混合物 3 min, 冷却后向下旋转混匀, 将管子放回冰上。再向以上反应液中按指定顺序加入如下试剂: 4 μL 无核酸酶

收稿日期: 2014-09-24

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31260610); 新疆生产建设兵团重大科技项目(编号: 2013AA003-3); 石河子大学优秀青年基金(编号: 2012ZRKYQ02)。

作者简介: 杨莉(1990—), 女, 新疆昌吉人, 硕士研究生, 研究方向为动物生理学。E-mail: 563289492@qq.com。

通信作者: 张莉, 博士, 副教授, 研究方向为动物生理与生化。E-mail: zhangli@shzu.edu.cn。

水 1、4 μL 5 × PrimeScript buffer 2、1 μL RT Prime Mix I、1 μL Prime Script RT Enzyme Mix I，终体积为 20 μL。加完样后轻柔混合，短暂离心，然后于 37 ℃ 孵育混合物 30 min，最后于 85 ℃ 加热 5 s 终止反应。反转录产物可直接用于 PCR 扩增，或于 -20 ℃ 保存(3 个月以内)，长期保存建议放于 -70 ℃。

1.2.4 目的基因 PCR 反应及克隆测序 利用常规 PCR 反应对组织样品中 *FAS*、*LPL* 基因进行扩增，将目标片段分别从琼脂糖凝胶中切下，按照 DNA 回收试剂盒说明回收目的片段，在 T<sub>4</sub>-DNA 连接酶作用下，经 16 ℃ 过夜连接 PGEM-T Easy 载体，用 CaCl<sub>2</sub> 法将连接产物转入大肠杆菌 *E. coli* DH5α 感受态细胞，经蓝白斑筛选阳性菌落后，挑取单菌落进行培养，然后从菌液中提取质粒，菌液送往上海华大基因科技有限公司测序。

1.2.5 基因序列分析 采用 DNAMAN 软件对 GenBank 中绵羊、山羊、牛、猪、斑马鱼、褐家鼠、马等 11 个物种和测序后的阿勒泰羊 *FAS*、*LPL* 基因的编码区核苷酸序列进行同源比对分析。用 MEGA5.1 软件构建进化树，进行遗传进化分析。

2 结果与分析

2.1 提取总 RNA

提取的总 RNA 经紫外分光光度计测定， $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  在 1.8~2.0 间，表明提取的总 RNA 无蛋白质和苯酚污染，纯度较高，可用于后续试验。

2.2 *FAS* 基因的 RT-PCR 扩增

以 RNA 反转录的 cDNA 为模板，以 *FAS*、*LPL* 的上、下游引物扩增，分别得到 256、181 bp 的条带(图 1、图 2)。

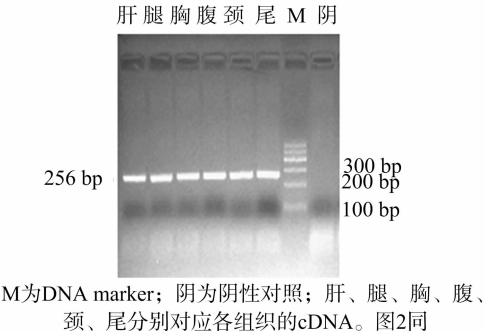


图1 *FAS* 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

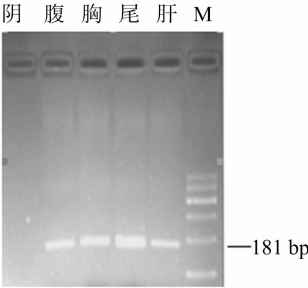


图2 *LPL* 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

2.3 *FAS*、*LPL* 基因测序结果与序列分析

将阿勒泰羊的 *FAS* 基因核苷酸序列与已公布的绵羊的相应序列进行分析比对，结果显示序列同源性为 99.61%；通过与 GenBank 数据库中绵羊、牛、小鼠等 11 个物种进行核苷

酸序列比对发现，阿勒泰羊 *FAS* 基因与绵羊的序列同源性最高，与西农萨能奶山羊的序列同源性最低；与牛、马、人、猪、褐家鼠的序列同源性均在 80%~95% 之间；与鸽、鸡的序列同源性分别为 72.66%、71.88%；与虎鲸的序列同源性最低，为 46.24% (表 1)。结果与传统分类相一致。

表 1 阿勒泰羊 *FAS* 序列同源性比较结果

动物种类	GenBank 登录号	序列同源性 (%)
绵羊 ( <i>Ovis aries</i> )	AB011671.1	99.61
山羊 ( <i>Capra hircus</i> )	NM_001285629.1	98.44
西农萨能奶山羊 ( <i>Capra hircus</i> breed Xinong Saanen)	DQ915966.3	96.90
牛 ( <i>Bos taurus</i> )	NM_001012669.1	94.92
马 ( <i>Equus caballus</i> )	XM_001491292.3	86.72
人 ( <i>Homo sapiens</i> )	NM_004104.4	86.72
猪 ( <i>Sus scrofa</i> )	NM_001099930.1	86.72
褐家鼠 ( <i>Rattus norvegicus</i> )	M76767.1	80.47
鸽 ( <i>Columba livia</i> )	XM_005515764.1	72.66
鸡 ( <i>Gallus gallus</i> )	NM_205155.2	71.88
虎鲸 ( <i>Orcinus orca</i> )	XM_004286940.1	46.24

将阿勒泰羊的 *LPL* 测序所得序列与 GenBank 中已公布的绵羊相应的核苷酸序列进行比对分析，结果显示，序列同源性为 100%；与哺乳动物中山羊、牛、猫、马、东非狒狒、人、小家鼠的序列同源性均在 75%~100% 之间；与禽类的同源性次之，为 62.98%；同源性最低的是罗非鱼，为 56.28% (表 2)。同源性结果与传统分类相一致。

表 2 阿勒泰羊 *LPL* 序列同源性比较结果

动物种类	GenBank 登录号	序列同源性 (%)
绵羊 ( <i>Ovis aries</i> )	DQ016298.1	100.00
山羊 ( <i>Capra hircus</i> )	NM_001285607.1	99.45
牛 ( <i>Bos taurus</i> )	NM_001075120.1	98.34
猫 ( <i>Felis catus</i> )	NM_001042567.1	88.95
马 ( <i>Equus caballus</i> )	XM_005607651.1	86.74
东非狒狒 ( <i>Papio anubis</i> )	NM_001112612.1	86.74
人 ( <i>Homo sapiens</i> )	NM_000237.2	86.73
小家鼠 ( <i>Mus musculus</i> )	NM_008509.2	81.22
豚鼠 ( <i>Cavia porcellus</i> )	NM_001172978.1	77.35
鸡 ( <i>Gallus gallus</i> )	NM_205282.1	62.98
罗非鱼 ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	NM_001279753.1	56.28

2.4 系统发育树分析

采用 MEGA 5.0 软件构建了 *FAS* 基因系统发育树。从图 3 可以看出，大分支分为 2 类，虎鲸为 1 个分支；其余 10 个物种聚为一大类，首先禽类的鸽子和鸡成为一类，后与马、褐家鼠以及人、猪聚成的小类合成一类，最后与平行的哺乳纲偶蹄目的绵羊、阿勒泰羊、山羊以及西农萨能奶山羊以及牛聚为一大类。

从 *LPL* 的基因系统发育树中可以看出，主支分为 2 支，第 1 主支以阿勒泰羊、牛、马、人、鸡等 11 个物种组成，另 1 支为罗非鱼。其中第 1 主支又分为 5 个分支，第 1 分支为阿勒泰羊与绵羊；第 2 分支主要为山羊、牛、猫、马；第 3 分支为东非狒狒、人；第 4 分支为小家鼠、豚鼠；第 5 分支为鸡(图 4)。

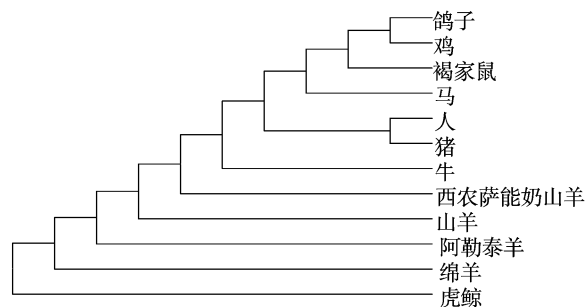


图3 12个物种FAS基因的系统发育树

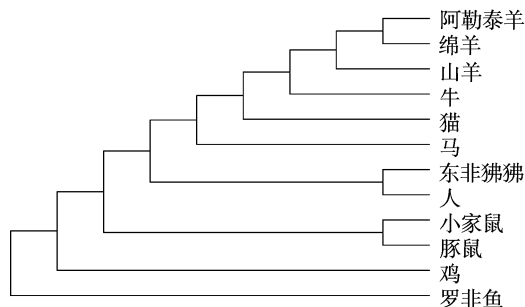


图4 12个物种LPL基因的系统发育树

### 3 讨论

脂肪的合成代谢与分解代谢始终处于一个平衡状态,主要是由甘油三酯的酯化、分解这2个过程主导,其相对速度决定了脂肪的分解或储存。FAS是脂肪合成的关键酶,LPL可以催化乳糜微粒、极低密度脂蛋白中的甘油三酯水解,因此对FAS、LPL基因的研究有助于深入了解脂肪代谢的分子机制。

有关人、鼠、猪、牛等哺乳动物FAS基因的结构、定位、表达研究已有报道<sup>[7-9]</sup>,从序列分析可以看出,阿勒泰羊FAS基因与羊亚科的西农萨能奶山羊的序列同源性较低,这可能与地理环境的差异有关。Krichgessner等从绵羊脂肪组织中克隆测序得到1 656 bp的部分LPL基因序列<sup>[10-11]</sup>;为获得绵羊全长LPL基因,Bonnet等通过3'-RACE方法获得了1 917 bp的绵羊LPL基因序列<sup>[12]</sup>,并与Edwards等获得的LPL基因序列拼接后得到共3 529 bp的绵羊LPL全长cDNA序列,通过Southern Blotting方法定位在绵羊第2号染色体上。本试验克隆测序阿勒泰羊LPL基因的cDNA发现,与GenBank中收录的9种哺乳动物中LPL基因cDNA序列表现了较高的同源性及其进化上的保守性。

采用MEGA5.0软件构建了FAS与LPL基因的系统进化树,进化树上分支节点越近,说明基因序列间遗传距离也相对较近;11个物种构建的系统进化树表明FAS基因中阿勒泰羊和绵羊具有最近的遗传关系,而与虎鲸的亲缘关系最远,LPL基因与罗非鱼的亲缘关系较远,其结果均正确地反映了物种

间的进化关系。

随着分子生物学技术的出现和不断成熟,人们从分子生物学水平对脂肪代谢的调控进行了一些探索性的研究,而本研究获得了阿勒泰羊FAS、LPL基因的部分序列,为人们进一步对阿勒泰羊脂肪相关的研究和肉质性状的研究以及育种提供了理论基础,同时也为今后研究阿勒泰羊与牛亚科等近缘物种间分子进化和遗传分化奠定了一定的理论基础。

### 参考文献:

- [1] 李金保,别克·木哈买提,库拉西,等. 地方良种阿勒泰羊[J]. 新疆畜牧业,2008(1):31-33.
- [2] Clarke S D. Regulation of fatty acid synthase gene expression; an approach for reducing fat accumulation[J]. Journal of Animal Science, 1993,71(7):1957-1965.
- [3] Jayakumar A, Tai M H, Huang W Y, et al. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(19):8695-8699.
- [4] Hsu M H, Chirala S S, Wakil S J. Human fatty acid synthase gene [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271:13584-13592.
- [5] Kameda K, Goodridge A G. Isolation and partial characterization of the gene for goose fatty acid synthase [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(1):419-426.
- [6] Goldberg I J. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis [J]. Journal of Lipid Research, 1996, 37(4):693-707.
- [7] Morris C A, Cullen N G, Glass B C, et al. Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat [J]. Mammalian Genome, 2007, 18(1):64-74.
- [8] Muñoz G, Ovilo C, Noguera J L, et al. Assignment of the fatty acid synthase (FASN) gene to pig chromosome 12 by physical and linkage mapping [J]. Animal Genetics, 2003, 34(3):234-235.
- [9] Roy R, Gautier M, Hayes H, et al. Assignment of the fatty acid synthase (FASN) gene to bovine chromosome 19 (19q22) by *in situ* hybridization and confirmation by somatic cell hybrid mapping [J]. Cytogenetics and Cell Genetics, 2001, 93(1/2):141-142.
- [10] Krichgessner T G, Chuat J C, Heinzmann C, et al. Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86(24):9647-9651.
- [11] Edwards W D, Daniels S E, Page R A, et al. Cloning and sequencing of a full length cDNA encoding ovine lipoprotein lipase [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1993, 1172(1/2):167-170.
- [12] Bonnet M, Leroux C, Chilliard Y, et al. Rapid communication: nucleotide sequence of the ovine lipoprotein lipase cDNA [J]. Journal of Animal Science, 2000, 78(11):2994-2995.