

杨文平,王爱民,於叶兵,等. 梭鱼脂肪酸合成酶基因部分片段的克隆和表达分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(23):49-54.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.014

梭鱼脂肪酸合成酶基因部分片段的克隆和表达分析

杨文平^{1,2}, 王爱民¹, 於叶兵¹, 刘 飞¹, 吕林兰¹, 吕 富¹

(1. 盐城工学院海洋与生物工程学院/江苏省沿海池塘养殖生态重点实验室/江苏省沿海养殖鱼类饲料工程技术研究中心,江苏盐城 224051;
2. 南京农业大学动物科技学院/江苏省动物源食品生产与安全保障重点实验室,江苏南京 210095)

摘要:分离、克隆梭鱼脂肪酸合成酶(fatty acid synthase,简称FAS)基因的部分cDNA片段(GenBank登录号为KJ848474),共920 bp,编码303个氨基酸,序列分析表明梭鱼FAS基因与其他物种的同源性为74%~95%,其中与军曹鱼、斑马拟丽鱼相似性达95%。FAS基因mRNA在梭鱼鱼皮、肌肉、肝脏、心脏、脾脏、肾脏、胃、肠、腹腔脂肪、脑和鳃组织中表达丰度差异显著($P<0.05$),脑中含量最高,其次是肝脏和腹腔脂肪组织,肌肉中表达量最低,其余7种组织中的表达量均显著低于脑和肝脏($P<0.05$)。此外,还研究了饲料脂肪水平对梭鱼FAS活性和mRNA表达的影响,平均质量为 (9.5 ± 0.3) g的梭鱼幼鱼投喂6种不同脂肪含量的等氮等能饲料(脂肪水平分别为2.04%、4.83%、7.47%、9.79%、12.01%、14.59%),饲养60 d,试验结束后测定各组梭鱼肝脏中FAS的生物活性及肝脏、腹腔脂肪、肌肉中FAS mRNA的表达丰度。结果表明,随着饲料脂肪水平的升高,肝脏中FAS活性呈降低趋势,14.59%组的活性显著低于2.04%、4.85%组($P<0.05$);肝脏中FAS的mRNA表达量显著下降($P<0.05$);肌肉和腹腔脂肪中FAS的mRNA表达量呈下降趋势,但各组之间差异不显著($P>0.05$)。

关键词:梭鱼;脂肪水平;脂肪酸合成酶;克隆;基因表达分析活性;同源性;系统进化树

中图分类号: Q78;Q959.478 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0049-06

梭鱼(*Liza haematocheila*)属鲷形目鲷科梭属鱼类,是温带浅海区重要的经济鱼类之一,具有广盐性、广温性、适应性广、病害少、味道鲜美等诸多优点,目前是江苏沿海正在开发的海淡水养殖新兴品种之一。在目前的养殖中,较易出现腹部肥大的症状:解剖后,可见肠道表面脂肪覆盖明显,肝脏肥大;此种体形与梭鱼本该具有的长流线形身体不符,不受消费者欢迎;有关梭鱼产生上述症状的原因,目前并无研究。鱼类内脏尤其是肝脏脂肪过度聚积,产生脂肪肝或腹部肥大,这是由于脂代谢紊乱造成脂肪在内脏内的沉积而出现的病理、生理学改变,它的发生、发展跟脂代谢关键因子有重要联系,脂代谢关键因子在这一过程中到底如何作用?是否可以通过营养调控的角度减少或避免此类症状的产生?脂代谢相关的基因众多,脂肪酸合成酶(fatty acid synthase,简称FAS)是脂代谢过程中的关键酶之一。动物体内脂肪的沉积量是脂肪的合成和降解过程动态平衡的结果,其合成和分解过程都是通过一系列酶催化完成的。动物体脂沉积所需要的脂肪酸大多来自脂肪酸的全程合成,即由FAS催化乙酰辅酶A和丙二酸单酰辅酶A合成脂肪酸,FAS活性的高低对控制动物体脂沉积具有重要意义^[1]。因此,本研究克隆了梭鱼FAS基因的cDNA部分序列,并与其他物种进行同源性比较、系统发生进化树分析组织特异性表达,为进一步研究梭鱼的脂肪代谢机

制奠定分子生物学基础。此外,梭鱼的营养需求研究基础薄弱,配合饲料的生产主要借鉴其他杂食性鱼类的营养需要,不合理的营养水平也可能是产生腹部肥大的原因。作为水产动物重要的营养素之一,脂肪是鱼类重要的能源物质,不同的鱼对脂肪的需求不同,饲料中不合理的脂肪水平会导致鱼体腹部累积大量的脂肪^[2-3]。因此,本研究针对饲料脂肪水平对FAS基因表达的影响进行初探,从营养和基因表达调控的角度了解梭鱼的脂质代谢,为梭鱼的健康养殖提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验设计

基因克隆和组织特异性表达用鱼由江苏省响水县一个养殖场提供,鱼体质量约300 g,运回后饲养于体积约3 000 L的水泥池(3 m×1 m×1 m)中,用普通商品饲料喂养,适应2周后即挑选10尾健康的梭鱼,用MS-222麻醉,于无菌操作下解剖,取鱼皮、肌肉、肝脏、心脏、脾脏、肾脏、胃、肠、腹腔脂肪、脑和鳃11种组织,用液氮速冻后于-80℃冰箱中保存备用。

脂肪水平试验用鱼由江苏省射阳县朱水平水产苗种有限公司提供,运回后用5%食盐水消毒,然后放入水泥池(3 m×1 m×1 m)中驯养10 d,挑选540尾健康无伤、规格均一的鱼种[均质量 (9.5 ± 0.3) g],随机分为6组,饲养于循环流水养殖桶中(规格:直径80 cm、高度70 cm、体积约300 L),每组设置3个重复,每个重复30尾鱼,分别投喂6种不同的饲料。6种饲料配制如下:以鱼油为脂肪源,添加水平分别为0%、2.5%、5.0%、7.5%、10.0%、12.5%,进口鱼粉、豆粕等为主要蛋白源,制成脂肪含量分别为2.04%、4.83%、7.47%、9.79%、12.01%、14.59%,蛋白质含量为30.32%的6组等氮

收稿日期:2016-07-15

基金项目:苏北科技计划(编号:BN2014033);江苏省产学研前瞻性联合研究项目(编号:BY2016065-18)。

作者简介:杨文平(1981—),女,河南漯河人,硕士,讲师,主要从事水产动物营养与饲料研究。E-mail:yangwenping@ycit.edu.cn。

通信作者:王爱民,博士,副教授,主要从事水产动物营养与饲料研究。E-mail:blueseawam@ycit.cn。

等能饲料,配方见已发表文献[4]。正式饲养期间,投饲率为鱼体总质量的 3% ~ 5%,每天分 3 次投喂,投喂时间为 06:30、12:30、18:30,试验期间除投喂外全天充氧,水温控制在(24±2)℃,养殖 60 d。试验结束后饥饿 24 h,用 MS-222 对鱼进行麻醉,每个重复取 3 尾鱼,无菌操作下取肝脏、肌肉、腹腔脂肪用液氮速冻,然后放入-80℃冰箱中保存备用。

1.2 试剂及仪器

Trizol Reagent(Promega)、反转录酶 M-MLV、RnaseH、TdT 酶、Taq 酶、连接酶、SYBR® ExScript™ RT-PCR Kit 试剂盒均购自 TaKaRa(大连);Taq 酶、胶回收试剂盒、pUCm-T 载体购自上海申能博彩生物科技有限公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α 由无锡淡水渔业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保存;定量 PCR 采用进口 Axygen PCR 管。鱼 FAS 酶联免疫分析试剂盒购于上海江莱生物科技有限公司,其他常规化学药品均为分析纯。

荧光定量 PCR 仪(CFX96™ Real-Time PCR Detection System,美国伯乐 Bio-Rad 公司);普通 PCR 仪(T100™ Thermal Cycler,美国伯乐 Bio-Rad 公司);冷冻型台式大容量高速离心机(Centrifuge 5804R,德国艾本德 Eppendorf 公司);核酸蛋白测定仪(Biophotometer plus,德国艾本德 Eppendorf 公司);超低温冰箱(Forma 900 series,美国热电 Thermo 公司);多功能酶标仪(Infinite M200,瑞士帝肯 Tecan 集团公司)。

1.3 方法

1.3.1 肝脏组织 FAS 活性测定 称取适量的组织样品,按 1:9 的质量体积比加入 0.65% 生理盐水制成 10% 匀浆液,3 000 r/min 离心 15 min,取上清液进行测定,具体方法按照试剂盒说明书进行。

1.3.2 引物设计与合成 通过同源比对设计兼并引物,FAS-F 和 FAS-R 扩增 FAS 中间片段。根据已经分离出的梭鱼 FAS cDNA 部分片段(GenBank 登录号为 KJ848474),使用 Codehop 原理设计 FAS 荧光定量引物 F1 和 R1,根据梭鱼 β -actin 的部分序列(GenBank 登录号为 EF638008.1)设计梭鱼 β -actin 荧光定量引物 F2 和 R2,引物序列见表 1,所有引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,扩增的片段为 80 ~ 120 bp。

表 1 FAS 基因序列测定和荧光定量 PCR 引物	
引物名称	序列(5'→3')
FAS-F	GGNGTDGAYATGGTNACAGADGA
FAS-R	GCHGGYTCHGRTGNCCCAT
F1	TATGAGGCTATCGTAGATGGAGGAC
R1	GAGCCACTCACCCCCATGTAG
F2	TGATGAAGCCCAGACGAAGAG
R2	TTGTAGAAGGTGTGATGCCAGAT

1.3.3 FAS cDNA 部分片段的分离 (1)RNA 的抽提。取新鲜的约 50 mg 的梭鱼肝脏,根据 Trizol Reagent/总 RNA 提取说明书操作,抽提总 RNA。使用紫外分光光度计核酸蛋白仪测定 RNA 的浓度,并根据 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 的比值介于 1.8 ~ 2.0 之间,判断 RNA 的质量。

(2)cDNA 第 1 条链的合成。按照反转录试剂盒说明书进行反转录反应,反应条件为:42℃ 40 min,90℃ 2 min;4℃

下保温至关机,所得的模板(cDNA 溶液)于-20℃保存备用。

(3)FAS 基因中间片段的获得。使用兼并引物 FAS-F/FAS-R 扩增 FAS 中间片段,PCR 反应体系见表 2,反应条件为:94℃ 预变性 3 min;94℃ 1 min,58℃ 1 min,72℃ 1 min,30 个循环;最后 72℃ 10 min,-20℃保存产物。

表 2 FAS 中间片段扩增 PCR 反应液组成	
反应组分	含量(μL)
模板(cDNA 溶液)	2.00
10×PCR Buffer	2.50
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2.00
dNTP(ea. 10 mmol/L)	0.50
FAS-F(10 μmol/L)	1.00
FAS-R(10 μmol/L)	1.00
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.25
无 RNA 酶水	加至总体积 25.00

(4)PCR 产物的分离和纯化。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,用 pMD18-T 载体克隆,酶切鉴定,由上海英俊生物技术有限公司测序。

1.3.4 SYBR 荧光定量 RT-PCR 按照“1.3.3”中 RNA 的抽提方法提取皮肤、肌肉、肝脏、心脏、脾脏、肾、胃、肠、腹脂、脑、鳃 11 种组织的 RNA 样品,用于组织特异性表达研究。提取不同脂肪水平下梭鱼的肌肉、肝脏和腹腔脂肪组织 RNA 样品,测定不同脂肪水平对 FAS mRNA 表达的影响。采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 扩增反应。首先,采用 PrimeScript™ RT Master Mix 反转录试剂盒进行反转录反应,反应总体积为 20 μL,反转录成 cDNA,反转录反应液组成见表 3,反转录反应条件为:37℃ 15 min,85℃ 5 s,产物-20℃保存备用。以合成的 cDNA 为模板,进行 Real Time PCR 反应,荧光定量 PCR 反应液组成见表 4。采用两步法 PCR 扩增程序:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s,40 个循环。融解曲线温度设置在 65 ~ 95℃。

表 3 荧光定量反转录反应液组成	
反应组分	含量
总 RNA	1 000 ng
5×PrimeScript RT Master Mix*	4 μL
无 RNA 酶水	加至总体积 20 μL

注:*表示含有反转录酶 PrimeScript RTase、RNA 酶抑制剂、随机六聚体引物 Random 6 mers、Oligo dT Primer、dNTP Mixture、反应 Buffer(含有 Mg²⁺)。

表 4 荧光定量 PCR 反应液组成	
反应组分	含量(μL)
SYBR® premix Ex Taq(Tli RNaseH Plus)(2×)	12.5
PCR 正向引物(10 μmol/L)	0.5
PCR 反向引物(10 μmol/L)	0.5
模板(cDNA 溶液)	1.0
无 RNA 酶水	10.5
总体积	25.0

1.4 数据统计与分析

1.4.1 FAS cDNA 序列分析 所获得的 FAS cDNA 片段,应用网站(<http://www.bio-soft.net/sms/>)中的 Translate 程序

进行氨基酸序列推倒,用软件 ClustalW 1.81 对氨基酸序列和基因库中其他动物的序列进行比对,比对结果用 MEGA 6.06 计算系统发育关系,用 Neighbor – Joining 法构建进化树,并设置 1 000 次的自展值 Bootstraps 计算评估其可信度。

1.4.2 荧光定量 RT – PCR 结果统计 以梭鱼 β – *actin* 为内参,对得到的各样品循环数 (C_T) 值进行均一化处理;以肌肉组织 *FAS* 基因的表达量为对照,使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[5] 计算 11 种组织中 *FAS* mRNA 的表达丰度;以脂肪水平最低组 *FAS* 基因的表达量为基准,使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[5] 计算不同饲料脂肪水平下 *FAS* mRNA 的表达丰度。

1	GGG GTT GAT ATG GTG ACA GAT GAC AAC CGG CGG TGG ACA CCA GGT CTG TAT GGT CTT CCA
1	M V T D D N R R W T P G L Y G L P
61	AAG AGA AAC GGT AAA CTG AAT GAC ATC AGC CAC TTC GAT GCA GCC TTC TTT GGA GTC CAC
18	K R N G K L N D I S H F D A A F F G V H
121	CCT AAA CAG GCC AAT ACC ATG GAC CCC CAG CCC CGT CTC ATG CTG GAG ATC GCC TAT GAG
38	P K Q A N T M D P Q P R L M L E I A Y E
181	GCT ATC GTA GAT GGA GGA CTG AAC CCA GCC TCG CTG CGT GGC AGT AAG ACA GGC GTC TAC
58	A I V D G G L N P A S L R G S K T G V Y
241	ATC GGG GTG AGT GGC TCG GAG GCT GGT GAG GCG TTC AGC AGA GAC CCA GAA GAA CTT CTG
78	I G V S G S E A G E A F S R D P E E L L
301	GGC TAC AGC ATG ACC GGC TGC CAG CGT GCC ATG TTG GCC AAT AGG CTC TCC TAT TTC TTT
98	G Y S M T G C Q R A M L A N R L S Y F F
361	GAC TTC AGC GGC CCC AGC ACC GCC ATA GAC ACA GCC TGC TCC TCC AGC TTG CTG GCT TTA
118	D F S G P S T A I D T A C S S S L L A L
421	GAA AAT GCC TTT CAC GCC ATT CGT CAG GGC CAC TGT GAT GCC GCT CTG GTG GGC GGA GTC
138	E N A F H A I R Q G H C D A A L V G G V
481	AAC CTG CTG CTC AAG CCA AAC ACC TCG GTG CAG TTC ATG AAA CTG GGC ATG CTC AGT CCT
158	N L L L K P N T S V Q F M K L G M L S P
541	GAG GGC ACT TGC AAG TCC TTC GAC TCA TCA GGA AAT GGA TAC TGC CGT TCT GAA GCA GCA
178	E G T C K S F D S S G N G Y C R S E A A
601	GTA GCA GTG CTG CTC ACC AAG CGA TCT ATG GCT AAA AGG GTC TAC GCA ACA GTC ATC AAT
198	V A V L L T K R S M A K R V Y A T V I N
661	GCA GGC AAC AAC ACA GAT GGA TAC AAA GAG CAA GGT GTG ACA TTT CCC TCT GGT GAG ATG
218	A G N N T D G Y K E Q G V T F P S G E M
721	CAA CAG AGG CTG GTT CGC TCC CTC TAC CAG GAA GCC AAC ATA ACA GCT GAG CAG GTG GAG
238	Q Q R L V R S L Y Q E A N I T A E Q V E
781	TAC GTT GAA GCG CAC GGC ACA GGA ACA AAG GTT GGG GAC CCA CAG GAG GTC AAT GGT ATC
258	Y V E A H G T G T K V G D P Q E V N G I
841	GTC AGT GTT TTC TGT GAA TCA AAG AGA GAG CCT TTG CTT ATT GGC TCC ACC AAG TCT AAC
278	V S V F C E S K R E P L L I G S T K S N
901	ATG GGT CAT CCA GAA CCA GC
298	M G H P E P

起始密码子用加粗斜体标注

图1 梭鱼 *FAS* 基因 cDNA 序列和翻译的氨基酸序列

为确定 *FAS* 的进化关系,从基因库中收集了军曹鱼 (*Rachycentron canadum*, ACZ55138. 1)、斑马拟丽鱼 (*Maylandia zebra*, XP 004571519. 1)、尼罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, XP 003454104. 1)、鲮鱼 (*Oryzias latipes*, XP 004080750. 1)、银鲫 (*Carassius gibelio*, AHA42647. 1)、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*, AHK05976. 1)、鸡 (*Gallus gallus*, NP99048. 6)、老鼠 (*Rattus norvegicus*, AAA41145. 1)、人 (*Homo sapiens*, AAH63242. 1)、恒河猴 (*Macaca mulatta*, XP 001113076. 1)等 *FAS* 氨基酸序列。用 ClustalW 1.8 把梭鱼

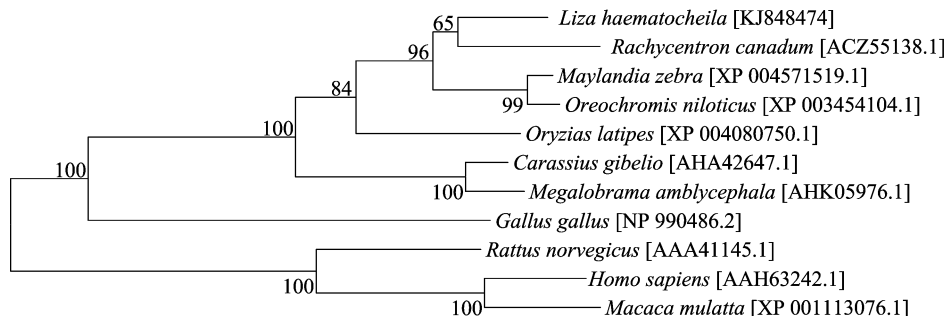
1.4.3 数据统计 试验数据先用 Excel 2007 作初步处理后,采用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析,并用邓肯氏进行多重比较,显著水平为 $\alpha=0.05$,数据均用“平均值 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 梭鱼 *FAS* 基因的克隆与序列分析

使用梭鱼肝脏 cDNA 为模板,扩增梭鱼 *FAS* cDNA 部分片段,部分序列和氨基酸翻译结果见图 1,序列长度为 920 bp,编码 303 个氨基酸,该序列已经登录 GenBank,登录号为 KJ848474。

FAS 氨基酸序列同它们进行同源性比较,同时使用上述比对结果,采用 Neighbor – Joining 方法构建系统发育树(图 2),上标数据为 1 000 次自展值 Bootstrap 检测的支持率。序列分析显示,梭鱼 *FAS* 基因与其他物种的同源性为 74% ~ 95%,与硬骨鱼类的 *FAS* 序列相似性最高,其中与军曹鱼、斑马拟丽鱼相似性达到 95%。此外,梭鱼 *FAS* 基因与其他物种的 *FAS* 基因同源性也较高,与鸡、老鼠的同源性为 80%、77%,与人、恒河猴的同源性为 74%。以上结果显示,在氨基酸水平上,本试验所克隆到的 *FAS* 基因与其他物种具有高度的相似性,



蛋白质序列均源自 NCBI 数据库; 图中物种名后为序列登录号

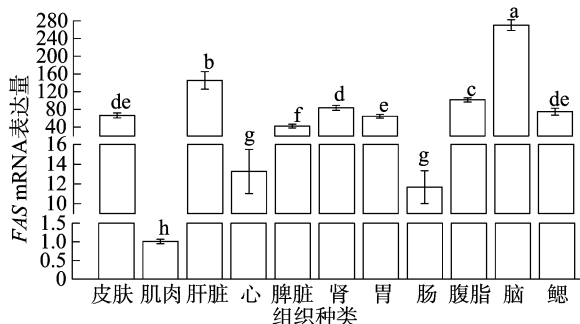
图2 根据 Neighbor-Joining 法构建的 FAS 系统进化树

判定是梭鱼的 FAS 基因, 且 FAS 基因在进化过程中较为保守。

系统发育树表明, 亲缘关系近的物种先聚在一起, 如梭鱼、军曹鱼以及斑马鱼等硬骨鱼类形成聚类, 然后才和亲缘性较远的人、鸡、老鼠、恒河猴形成聚类。说明亲缘性近的物种的 FAS 基因的同源性也高。

2.2 梭鱼 FAS 基因 mRNA 组织特异性表达

梭鱼 11 种组织中 FAS mRNA 的表达丰度见图 3。FAS mRNA 在 11 种组织中均有表达, 不同组织中的表达量部分之间差异显著 ($P < 0.05$), 从高到低依次为脑、肝脏、腹腔肠系膜脂肪、肾、鳃、皮肤、胃、脾、心、肠、肌肉。在肌肉中表达量最低, 高表达在脑、肝脏和腹腔肠系膜脂肪组织中, 分别为肌肉中表达量的 270.08、145.51、101.30 倍, 其余各组织中表达量均显著低于这 3 种组织 ($P < 0.05$)。FAS mRNA 在肾、鳃、皮肤、胃和脾脏 5 种组织中有中等程度的表达, 前 4 种组织中的表达量均显著高于脾脏 ($P < 0.05$); 在心脏和肠中表达量较低, 但显著高于肌肉 ($P < 0.05$)。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同
图3 梭鱼 FAS 基因在不同组织中的特异性表达

2.3 饲料脂肪水平对梭鱼肝脏中 FAS 活性的影响

饲料脂肪水平对梭鱼肝脏中 FAS 活性的影响见图 4。随脂肪水平的升高, 肝脏中 FAS 活性呈下降趋势, 脂肪水平为 2.04%、4.83%、7.47%、9.79%、12.01% 组之间差异不显著 ($P > 0.05$), 14.59% 组显著低于 2.04%、4.83% 组 ($P < 0.05$)。

2.4 饲料脂肪水平对梭鱼 FAS mRNA 表达水平的影响

梭鱼肝脏、腹腔脂肪、肌肉组织中 FAS mRNA 的相对表达量见图 5 至图 7。随着饲料脂肪水平的升高, 肝脏中 FAS mRNA 的表达丰度逐渐下降, 4.83%、7.47%、9.79% 这 3 组

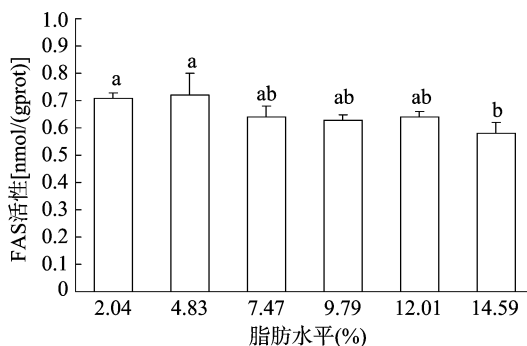


图4 饲料脂肪水平对梭鱼肝脏 FAS 活性的影响

之间差异不显著, 12.01%、14.59% 这 2 组之间差异不显著, 但均显著低于 2.04%、4.83% 组。腹腔脂肪和肌肉中 FAS mRNA 的表达丰度随脂肪水平的升高呈下降趋势, 但各组之间差异均不显著 ($P > 0.05$)。

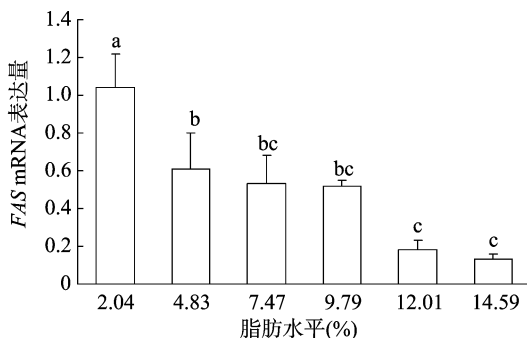


图5 饲料脂肪水平对梭鱼肝脏 FAS mRNA 表达丰度的影响

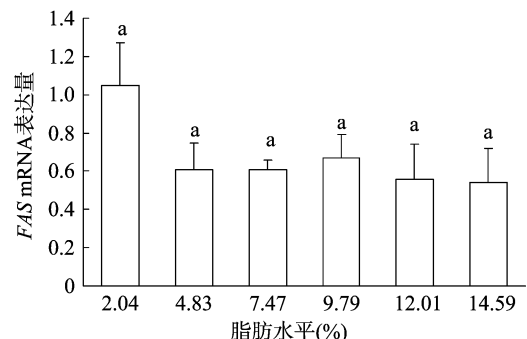


图6 饲料脂肪水平对梭鱼腹腔脂肪 FAS mRNA 表达丰度的影响

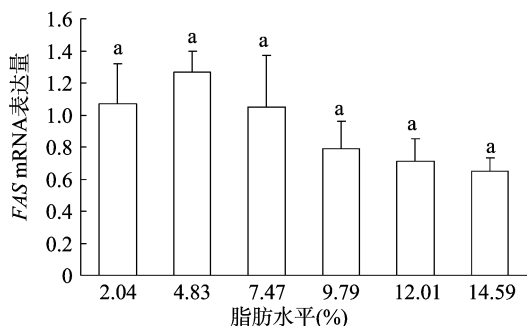


图7 饲料脂肪水平对梭鱼肌肉 FAS mRNA 表达丰度的影响

3 结论与讨论

FAS 是脂肪合成过程中的一个关键酶,催化乙酰辅酶 A 和丙二酸单酰辅酶 A 合成脂肪酸,对于控制动物体脂的沉积具有重要意义,开展 FAS 基因的克隆及表达分析,有助于从分子学的角度探索脂肪代谢和合成的规律。鱼类中有关 FAS 基因的研究相对较少,主要有军曹鱼、斑马拟丽鱼、罗非鱼、团头鲂等,因此鱼类 FAS 基因的结构、功能和表达信息还有待于进行大量的研究。本研究从梭鱼中克隆了 FAS cDNA 的部分序列(GenBank 登录号为 KJ848474),长度为 920 bp,编码 303 个氨基酸。通过系统进化树分析可知,FAS 基因具有较高的保守性,梭鱼和其他物种相似性较高,其中和鱼类的相似性最高。

有关 FAS mRNA 的组织特异性表达,已有研究者在不同的生物体内作了研究,但研究结果各不相同。在番鸭的研究中发现,FAS mRNA 在肝脏和腹脂中表达量最高,在脾脏、肺脏和下丘脑中表达量次之,在心脏、肾脏、肌胃、腺胃、胸肌、腿肌、十二指肠中表达量很少或几乎不表达^[6]。但在猪体内,FAS mRNA 高表达在脂肪组织、肝脏、小脑和胃中^[7]。匙吻鲟肝脏中 FAS mRNA 的表达量最高,其次是腹腔脂肪,肌肉、肠道、心脏、鳃、鳍条、眼睛、胃和吻这 8 种组织中只有少量的表达^[8]。而鳙鱼咽上组织中 FAS mRNA 表达量最高,其次是肠道组织,在肝脏、肌肉、心脏、鳃、鳍和眼中的表达水平显著低于咽上器官^[8]。覃川杰在瓦氏黄颡鱼的研究中指出,FAS mRNA 主要在肠道、肝脏、腹腔脂肪、肌肉和脑组织中表达,肠道中最高,肝脏中次之,显著高于后几种组织^[9]。本研究发现,FAS mRNA 在梭鱼脑、肝脏和腹腔肠系膜脂肪组织中有高表达,在肾脏、鳃、皮肤、胃、脾脏中有中等程度的表达,心脏、肠和肌肉组织中表达量较低。以上结果表明,FAS mRNA 的组织特异性表达在不同物种中既有一定的相似性(高表达一般在肝脏、腹腔脂肪组织),又有一定的差异性。不同物种不同组织合成脂肪的能力有所不同,猪主要在脂肪组织中合成脂肪,禽类和鱼类主要通过肝脏合成脂肪^[10-12]。基于不同时空条件和不同的发育阶段,同一组织细胞所处的状态各不相同。Kusakabe 等指出,FAS 较高表达出现在脂质代谢旺盛的细胞(如脂肪细胞、肝细胞、皮脂腺等)、处于增殖状态的细胞(如胎儿消化呼吸系统增殖上皮、胃、十二指肠上皮细胞)以及对激素敏感的细胞(如垂体前叶、乳腺、前列腺、子宫内膜等)中^[13]。这些可能是以上不同物种 FAS mRNA 组织表达差异性的原因。Semenkovich 指出,机体组织中 FAS mRNA 表达

水平的升高会增加甘油三酯在组织内的沉积而导致肥胖^[14]。夏晓杰等的研究也表明,齐口裂腹鱼肌间脂肪含量与 FAS mRNA 表达水平呈一定的正相关关系^[15]。而 FAS mRNA 在不同组织中的差异性表达是否会导致不同组织中脂肪的蓄积程度不同?目前该方面的研究已在肝脏和肌肉中有少量结果,即肝脏是鱼类合成脂肪的主要场所及脂肪蓄积的调节性储脂器官^[16-17]。在瓦氏黄颡鱼^[9]、吉富罗非鱼^[18]、齐口裂腹鱼^[15]中的研究均表明,肝脏中 FAS 基因的表达水平显著高于肌肉中,这可能是导致鱼类肝脏和肌肉脂肪蓄积差异的主要原因。研究鱼类脂代谢相关基因的组织差异性表达,可以从分子生物学的角度调控鱼体脂肪的沉积,为提高鱼体健康和鱼肉品质提供理论依据。

动物体内 FAS 活性的高低,受日粮营养素的影响,其中日粮中脂肪含量的高低及脂肪酸种类对 FAS 的活性起着重要的决定作用。有研究表明,饲料中脂肪水平的升高,会抑制鱼类 FAS 的活性^[19-20]。本研究发现,随着脂肪水平的升高,肝脏中 FAS 活性逐渐降低,进一步证实了高脂对 FAS 活性的抑制作用,中华绒螯蟹和白甲鱼的研究也得到了相同的结论^[21-22]。Weiss 等指出,当饲料提供的外源性脂肪酸充足时,不需要合成内源性脂肪酸,因此 FAS 活性下降^[23]。而 Clarke 等研究发现,日粮中脂肪对 FAS 活性起抑制作用,主要是脂肪酸抑制 FAS 基因的表达,这种抑制发生在转录水平,导致脂肪的合成减少,这种抑制能力和脂肪酸的数量、种类有关^[24-25]。本研究中所采用的鱼油含有大量 *n*-6 和 *n*-3 系列不饱和脂肪酸,是 FAS 表达的强抑制剂,因此高脂水平时 FAS 活性显著下降。

FAS 基因的表达受激素、摄食营养成分等的影响^[14]。大鼠在饲喂高碳水化合物饲料时,肝脏中 FAS mRNA 的表达量约为绝食时的 100 倍;喂高脂(玉米油和牛脂 1:1 混合)日粮时 FAS mRNA 的表达量比绝食时有所增加,但只有喂高碳水化合物时表达水平的 4%^[26]。大量研究表明,日粮中的脂肪酸对 FAS 基因的表达有抑制作用。抑制作用的强弱和脂肪酸的数量、碳链长度、双键位置、双键数量有关。第 1 个双键的位置为 *n*-9 时(位于碳链甲基端第 9、第 10 个碳原子之间),对 FAS 表达的抑制作用和饱和脂肪酸类似,基本无影响;第 1 个双键位于 *n*-3 时(在碳链甲基端第 3、第 4 个碳原子之间),抑制作用比位于 *n*-6 强(在碳链甲基端第 6、第 7 个碳原子之间)^[24,27-28]。Ikeda 等指出,二十二碳六烯酸(docosahexa enoic acid,简称 DHA)、二十五碳五烯酸(eicosapenta enoic acid,简称 EPA)和亚麻酸相比,显著降低了肝脏中 FAS 活性及肝脏和血浆中甘油三酯的浓度,DHA 和 EPA 相比,DHA 更有效,这说明同一系列的脂肪酸,双键数量多的对 FAS 表达的抑制作用更强^[29]。本研究发现,脂肪水平的升高,显著降低了梭鱼 FAS mRNA 的表达量,脂肪水平 4.83%、7.47%、9.79% 组表达量显著低于 2.04%、4.83% 组,12.01%、14.59% 组表达量显著低于其余各组,这可能是由于高脂肪水平的摄入,准确来讲是大量的 *n*-3 和 *n*-6 系列多个饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid,简称 PUFA)的摄入,使 FAS 基因的表达受到了抑制。这和马晶晶报道的饲料中含有较高含量的 *n*-3 高度不饱和脂肪酸(highly unsaturated fatty acid,简称 HUFA,大于 0.88%)时,黑鲷幼鱼

FAS 基因表达量显著下降的结论^[30]是一致的。Clarke 等在大鼠的研究中也指出,含有丰富 PUFA 的鱼油和红花油可以使肝脏中 *FAS* mRNA 的表达量降低 75% ~ 90%^[26]。本研究中随着脂肪水平的升高,腹腔脂肪和肌肉组织中 *FAS* mRNA 的表达量仅表现出下降趋势,各组之间差异并不显著;这可能和不同组织基因表达的特异性有关,Clarke 指出,脂肪酸对 *FAS* 基因表达的抑制具有组织专一性,肝脏中 *FAS* 基因的转录量决定了 *FAS* mRNA 的水平,但脂肪组织中 *FAS* mRNA 的水平除了取决于基因的转录量外,还和影响 *FAS* mRNA 稳定性的因素有关^[23]。目前,这方面的研究较少,尚需更深入的研究。

本研究克隆了梭鱼的 *FAS* 基因部分 cDNA 序列,通过系统进化树可知,*FAS* 基因具有较高的保守性,梭鱼和其他物种相似性较高;*FAS* 基因在梭鱼不同组织中的表达丰度差异显著,在脑、肝脏和腹腔脂肪组织中高表达,在肌肉中表达量最低;饲料脂肪水平能够抑制梭鱼肝脏中的 *FAS* 活性和 mRNA 的表达丰度,水平高时抑制作用更显著。

参考文献:

- [1] Chirala S S, Wakil S J. Structure and function of animal fatty acid synthase[J]. *Lipids*, 2004, 39(11): 1045 - 1053.
- [2] Tocher D R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish[J]. *Reviews in Fisheries Science*, 2003, 11(2): 107 - 184.
- [3] 程汉良, 夏德全, 吴婷婷. 鱼类脂类代谢调控与脂肪肝[J]. *动物营养学报*, 2006, 18(4): 294 - 298.
- [4] Yang W P, Wang A, Gao F, et al. Dietary lipid concentrations influence growth and chemical and fatty acid compositions of juvenile redlip mullet, *Liza haematocheila* [J]. *Aquaculture International*, 2015, 23(4): 981 - 996.
- [5] Kenneth J L, Thomas D S. Analysis of relative gene expression data using real - time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 - 408.
- [6] 张宜辉, 张蕊, 王健, 等. 番鸭脂肪合成酶基因的克隆及填饲对其 mRNA 水平的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(1): 84 - 87.
- [7] Braglia S, Zappaterra M, Zambonelli P, et al. Analysis of g. 265T > C SNP of fatty acid synthase gene and expression study in skeletal muscle and backfat tissues of Italian Large White and Italian Duroc pigs[J]. *Livestock Science*, 2014, 162: 15 - 22.
- [8] 施培松. 匙吻鲟和鳊的生长、肌肉品质比较及 *FAS* 基因克隆与表达[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013: 129 - 132.
- [9] 覃川杰. 瓦氏黄颡鱼脂肪代谢相关基因 cDNA 的克隆及表达分析[D]. 上海: 华东师范大学, 2010: 37 - 44.
- [10] Leveille G A. Glycogen metabolism in meal - fed rats and chicks and the time sequence of lipogenic and enzymatic adaptive changes [J]. *Journal of Nutrition*, 1966, 90: 449 - 460.
- [11] Leveille G A, Romsos D R, Yeh Y Y, et al. Lipid biosynthesis in the chick. A consideration of site of synthesis, influence of diet and possible regulatory mechanisms[J]. *Poultry Science*, 1975, 54(4): 1075 - 1093.
- [12] Greene D H, Selivonchick D P. Lipid metabolism in fish [J]. *Progress in Lipid Research*, 1987, 26(1): 53 - 85.
- [13] Kusakabe T, Maeda M, Hoshi N, et al. Fatty acid synthase is

- expressed mainly in adult hormone - sensitive cells or cells with high lipid metabolism and in proliferating fetal cells [J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2000, 48(5): 613 - 622.
- [14] Semenkovich C F. Regulation of fatty acid synthase (FAS) [J]. *Progress in Lipid Research*, 1997, 36(1): 43 - 53.
 - [15] 夏晓杰, 郭应龙, 冯姣, 等. 生长、肌肉品质和脂蛋白酯酶及脂肪合成酶基因表达的研究[J]. *食品科学*, 2015, 36(1): 164 - 169.
 - [16] Likimani T A, Wilson R P. Effects of diet on lipogenic enzyme activities in channel catfish hepatic and adipose tissue [J]. *Journal of Nutrition*, 1982, 112(1): 112 - 117.
 - [17] Liang X F, Ogata H Y, Oku H. 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]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 132(4): 913 - 919.
 - [18] 王爱民. 饲料脂肪水平对吉富罗非鱼生长及脂肪代谢调节的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011: 89 - 97.
 - [19] Shimeno S, Kheyyali D, Shikata T. Metabolic response to dietary lipid to protein ratios in common carp [J]. *Fisheries Science*, 1995, 61(6): 977 - 980.
 - [20] 王爱民, 韩光明, 韦信键. 吉富罗非鱼 *FAS* 基因的克隆及再投喂和饲料脂肪水平对其表达的影响[J]. *水产学报*, 2010, 34(7): 1113 - 1120.
 - [21] 李伟国, 温小波, 朱大世. 不同脂肪源对中华绒螯蟹幼蟹生长和脂肪合成酶活性的影响[J]. *长江大学学报(自然科学版)*, 2010, 7(4): 34 - 38.
 - [22] 向泉, 周兴华, 陈建, 等. 饲料脂肪水平对白甲鱼幼鱼形体指数、脂肪沉积和脂肪代谢酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2013, 37(9): 1349 - 1357.
 - [23] Weiss L, Hoffmann G E, Schreiber R, et al. Fatty - acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty - acid synthase [J]. *Biological Chemistry Hoppe - Seyler*, 1986, 367(2): 905 - 912.
 - [24] 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.
 - [25] Jump D B, Clarke S D, Thelen A, et al. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription [J]. *Progress in Lipid Research*, 1996, 35(3): 227 - 241.
 - [26] Clarke S D, Armstrong M K, Jump D B. Nutritional control of rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA abundance [J]. *The Journal of Nutrition*, 1990, 120(2): 218 - 224.
 - [27] Clarke S D, Armstrong M K, Jump D B. Dietary polyunsaturated fat uniquely suppress rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA content [J]. *The Journal of Nutrition*, 1990, 120(2): 225 - 231.
 - [28] Smith D R, Knabe D A, Smith S B. Depression of lipogenesis in swine adipose tissue by specific dietary fatty acids [J]. *Journal of Animal Science*, 1996, 74(5): 975 - 983.
 - [29] Ikeda I, Wakamatsu K, Inayoshi A, et al. α - linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids affect lipid metabolism differently in rats [J]. *The Journal of Nutrition*, 1994, 124(10): 1898 - 1906.
 - [30] 马晶晶. $n-3$ 高不饱和脂肪酸对黑鲫幼鱼生长及脂肪代谢的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2008: 80 - 95.