

黄颡鱼溶酶体酸性脂肪酶基因的cDNA序列、启动子及其转录调控分析

湛芳 仲崇超 陈姝为 张电光 吕武宏 谭肖英

MOLECULAR CHARACTERIZATION, TISSUE DISTRIBUTION AND TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF LYSOSOMAL ACID LIPASE (*LAL*) IN YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*)

CHEN Fang, ZHONG Chong-Chao, CHEN Shu-Wei, ZHANG Dian-Guang, L Wu-Hong, TAN Xiao-Ying

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2020.195>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

黄颡鱼 *Wnt* 家族4个基因的克隆、组织表达及对铜的响应

CLONING AND TISSUE EXPRESSION OF FOUR *WNT* GENES IN YELLOW CATFISH *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO* AND THEIR RESPONSE TO COPPER EXPOSURE

水生生物学报. 2018, 42(3): 463–472 <https://doi.org/10.7541/2018.058>

日本鳗鲡 *IFN- γ* 基因的鉴定、表达模式及启动子活性分析

CHARACTERIZATION, EXPRESSION PATTERN AND PROMOTER ACTIVITY ANALYSIS OF INTERFERON-GAMMA IN JAPANESE EEL, *ANGUILLA JAPONICA*

水生生物学报. 2017, 41(3): 589–602 <https://doi.org/10.7541/2017.76>

饲料鱼溶浆影响黄颡鱼的胆汁酸代谢及脂肪沉积

EFFECTS OF STICKWATER ON BILE ACID AND LIPID METABOLISM OF YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*)

水生生物学报. 2019, 43(4): 731–738 <https://doi.org/10.7541/2019.086>

饲料硒含量对黄颡鱼肠系膜脂肪组织中脂类代谢和miRNAs表达水平的影响

EFFECTS OF DIETARY SELENIUM ON LIPID METABOLISM AND MIRNAS EXPRESSION IN MESENTERIC ADIPOSE TISSUE OF YELLOW CATFISH *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*

水生生物学报. 2020, 44(4): 685–692 <https://doi.org/10.7541/2020.083>

黄颡鱼20 β -羟基类固醇脱氢酶 I 和 II 基因特征分析和表达模式研究

CHARACTERATION OF THE DUPLICATED 20 β -*HSD* GENES IN *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO* AND THEIR EXPRESSION PATTERNS AND REGULATIONS

水生生物学报. 2017, 41(5): 963–971 <https://doi.org/10.7541/2017.120>

黄颡鱼MHC class II基因全长的克隆及饲料维生素D₃对其组织表达的影响

FULL-LENGTH cDNA CLONING AND THE EFFECT OF DIETARY VITAMIN D₃ ON TISSUE EXPRESSION OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX-II IN YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*)

水生生物学报. 2017, 41(5): 992–999 <https://doi.org/10.7541/2017.124>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2021.2020.195

黄颡鱼溶酶体酸性脂肪酶基因的cDNA序列、 启动子及其转录调控分析

谌芳 仲崇超 陈姝为 张电光 吕武宏 谭肖英

(华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 通过分子结构、组织表达及启动子结构功能分析, 探讨黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)溶酶体酸性脂肪酶(Lysosomal acid lipase, *lal*)基因的分子特征及转录调控, 为*lal*在鱼类脂质代谢和转录水平的调控提供新的视野。实验采用RT-PCR和RACE克隆*lal*基因的cDNA全长序列, 其长度为1802 bp, 5'上游启动子长度为2052 bp, 其中ORF长度为1197 bp, 编码398个氨基酸, 理论蛋白分子量大小为45.42 kD, 等电点为7.70, 含有23个残基的信号肽、5个糖基化位点(Asn³⁵-Ile³⁶-Ser³⁷、Asn¹⁰¹-Thr¹⁰²-Ser¹⁰³、Asn²⁷³-Met²⁷⁴-Thr²⁷⁵、Asn³²⁰-Gln³²¹-Ser³²²、Lys¹⁶¹-Thr¹⁶²-Thr¹⁶³)、3个半胱氨酸(Cys²⁵⁷、Cys²⁶⁵、Cys²⁸⁴)、催化三元体(Ser¹⁷⁴、Asp³⁴⁴、His³⁷³)、一个“帽子”(Thr²⁰⁵-Val³²⁹)和一个“盖子”(Phe²³³-Leu²⁷²)结构域。氨基酸序列对比和系统发育树分析显示, 黄颡鱼的*lal*与斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)亲缘关系最近。组织表达分析显示, *lal*基因的mRNA在脾脏、肠和精巢表达量最高。黄颡鱼*lal*启动子上存在Sp1、STAT3、PPAR α 、FOXO1、PPAR γ 及HNF4 α 等转录位点, 启动子活性实验表明, -1507 bp/-1016 bp区域负调控启动子活性, -1016 bp/+51 bp区域正调控启动子活性。研究对黄颡鱼溶酶体酸性脂肪酶(*lal*)基因序列的分子特征进行了解析, 有助于了解鱼类*lal*的结构和功能, 为进一步研究鱼类脂质代谢的调控机制奠定基础。

关键词: 黄颡鱼; *lal*; 分子特征; 组织表达; 启动子

中图分类号: Q344⁺.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2022)01-0098-08



目前, 养殖鱼类普遍存在脂肪肝、内脏脂质过多和相关代谢紊乱的问题, 导致成活率下降、生长性能下降和抗病性下降等^[1]。在脂肪分解中除了中性脂肪酶介导的脂解外, 溶酶体酸性脂肪酶(Lysosomal acid lipase, LAL)承担着重要脂解功能。*lal*作为溶酶体中的酸性脂肪酶, 由*LIPA*基因编码, 主要作用是将胆固醇酯(Cholesteryl esters, CEs)和甘油三酯(Triglycerides, TGs)水解成游离的胆固醇(Free cholesterols, FCs)和脂肪酸(Free fatty acids, FFAs)^[2]。而*lal*在脂解反应中, 除了水解由低密度脂蛋白(Low density lipoprotein, LDL)内吞进入胞质内的CEs、TGs和REs(Retinyl esters, REs)以外^[3], 还通过自噬分解脂滴^[4]。人的LAL由372个氨基酸组成含有27个残基的疏水信号肽^[5]、6个N-糖基化

位点^[6], 并且通过与高尔基体中甘露糖-6-磷酸受体结合, 靶向溶酶体发挥其生理作用^[7]。目前有关LAL的研究多集中于哺乳动物的分子结构^[5]、*LIPA*基因突变或缺失导致脂肪沉积、肝脏病变^[8]、免疫功能下降^[9]和冠状动脉疾病^[10]等, 而有关*lal*在鱼类生长发育和生理营养过程中所起到的作用尚不清楚。

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)肉质细嫩、耐低温, 是我国重要的淡水经济养殖鱼类, 其养殖产量逐年增加^[11]。鉴于*lal*对脂质代谢的重要作用, 为深入解析*lal*功能, 本实验首先克隆黄颡鱼*lal*基因全长的cDNA序列, 进行生物信息学分析并探讨其组织表达模式, 然后从启动子结构及活性分析研究黄颡鱼*lal*的转录调控方式, 以期深入解析黄颡鱼*lal*基因的功能奠定基础。

收稿日期: 2020-08-31; 修订日期: 2021-02-16

基金项目: 国家自然科学基金(32172983和31572605); 科技部“蓝色粮仓”科技创新专项(2018YFD0900400)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (32172983 and 31572605); National Key R & D Program of China (2018YFD0900400)]

作者简介: 谌芳, 硕士研究生; 主要从事鱼类营养代谢和饲料配方研究。E-mail: chenfang95@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 谭肖英, 博士, 副教授; 从事鱼类分子营养研究。E-mail: txy7933@mail.hzau.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 试验鱼及样品采集

本实验的黄颡鱼分为2组,购自武汉市农贸市场。黄颡鱼样品采集参照本实验室的方法^[12]。第一组黄颡鱼,取肝脏和卵巢组织用于*lal*基因cDNA全长序列的克隆,取肝脏、脾脏、肾脏、肠道、肠系膜脂肪、肌肉、大脑、心脏和性腺组织用于组织表达水平的测定。第二组黄颡鱼用于*lal*基因的启动子克隆,取样参照本实验室的方法^[13],随机选取黄颡鱼3尾,麻醉后冰浴上迅速剪取尾鳍进行总DNA提取。

1.2 实验材料

凝胶回收试剂盒购自Omega公司;TRIzol总RNA提取试剂盒、胰蛋白酶、DNA提取试剂盒、Lipo2000转染试剂盒、DMEM培养基和新生胎牛血清(FBS)等购自Invitrogen公司;其他分子试剂均购自TaKaRa公司;化学试剂均为分析纯,购自上海国药;胰蛋白酶、酵母提取物、琼脂粉、大肠杆菌DH5 α 感受态细胞和氨苄青霉素等购自武汉迪跃创新生物有限公司。HEK293T细胞株来自华中农业大学水产学院细胞资源中心。

1.3 黄颡鱼*lal*基因cDNA序列的克隆及测序

根据本实验室已有的方法^[12],参照Invitrogen的TRIzol说明书进行总RNA的提取。1%的琼脂糖凝胶电泳和Nanodrop ND-2000分光光度计检测总RNA的质量和纯度。用TaKaRa的反转录试剂盒(PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit)进行反转录。

根据GenBank数据库中已报道的黄颡鱼*lal*基因序列,用Premier 5.0分别设计3'和5' RACE特异性引物(表1),通过巢式PCR反应进行末端的扩增,第一轮PCR反应参数:95 $^{\circ}$ C 5min;然后95 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 25个循环;72 $^{\circ}$ C 5min。第二轮PCR反应参数:95 $^{\circ}$ C 3min;95 $^{\circ}$ C 30s, 57 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30个循环;最后72 $^{\circ}$ C 5min。

1.4 序列分析

用Seqman软件将扩增得到的核心片段、3'和5'末端序列拼接,从而获得基因cDNA全长。利用NCBI进行BLAST,以确定该序列对应的基因亚型(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)。同时,利用NCBI中ORF finder软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)找出开放阅读框(ORF)并翻译成氨基酸序列。信号肽用Signal 5.0在线软件预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>),通过在线软件Expasy(https://web.expasy.org/compute_pi/)预测蛋白分子量大小及等

电点,NetNGlyc 1.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)分析N-糖基化位点,使用Clustal-W软件进行序列比对和氨基酸同源性分析。用MEGA 5.0软件采用邻接法(NJ)构建进化树^[14],选择的最适进化模型为JTT+G^[15],每个节点的可信值进行1000次重复计算。

1.5 黄颡鱼LAL三维结构模型分析

利用SWISS-MODEL同源蛋白建模构建黄颡鱼LAL蛋白质的三维模型,选择狗的胃脂肪酶(PDB code 1k8q.1)^[16]作为合适的结构模板,其中两者序列一致度达到56.84%。用VMD 1.9.2(<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>)显示和分析得到蛋白单体的理论模型。

1.6 黄颡鱼*lal*基因的组织表达分析

参照文献[12],利用实时荧光定量PCR(q-PCR)方法检测*lal*基因在黄颡鱼不同组织中的表达。q-PCR反应参数:95 $^{\circ}$ C 30s;95 $^{\circ}$ C 5s, 57 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 40个循环。选用 β -actin和ubce作为内参基因,相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算^[17]。荧光定量引物见表1。

1.7 黄颡鱼*lal*基因启动子的克隆及质粒构建

利用RNA连接酶介导的5' cDNA末端快速扩增(RLM-5' RACE)方法鉴定黄颡鱼*lal*的5' cDNA序列和转录起始位点(Transcription start sites, TSS)。启动子克隆是基于上一步得到的5'末端的DNA序列及已发表的黄颡鱼^[18]的基因组,实验过程参照本实验室已有的方法^[13]。利用Omega试剂盒从黄颡鱼尾鳍中提取基因组DNA,并设计具有酶切位点的特异性引物(表2),将PCR产物和pGL3-Basic质粒纯化

Tab. 1 Primers used for *lal* cDNA cloning and PCR

引物Primer	核苷酸序列Sequence (5'—3')
3'- <i>lal</i> -O	AATCAGTCAACCCCTCCAT
3'- <i>lal</i> -I	CTGGGAGCACCTGGACTTC
5'- <i>lal</i> -O	CAGGCTTAGGCTCTGCTT
5'- <i>lal</i> -I	AGGCTCTGCTTCTTGGA
<i>lal</i> -F	GTTTCGAGGTGGTCACTGAGG
<i>lal</i> -R	CTGGTGTGGGAAGTTGGT
β -actin-F	GCACAGTAAAGGCGTTGTGA
β -actin-R	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC
ubce-F	TCAAGAAGAGCCAGTGGAGG
ubce-R	TAGGGGTAGTCGATGGGGAA
<i>rpl</i> -7-F	GGCAAATGTACAGGAGCGAG
<i>rpl</i> -7-R	GCCTGTGAGCTTGACGAA
<i>gapdh</i> -F	TTTCAGCGAGAGAGACCCAG
<i>gapdh</i> -R	ATGACTCTCTTGGCACCTCC

并使用相应的内切酶(*Hind* III和*Sac* I)消化,重组连接按照ClonExpress™ II One Step Cloning Kit说明书操作。简要操作步骤如下:第一轮进行RT-PCR反应:95°C 3min;95°C 15s,57°C 15s,72°C 50s,35个循环;72°C 3min。以第一轮PCR产物为模板,加入含有酶切位点的引物进行第二轮PCR:95°C 3min;95°C 15s,55°C 30s,72°C 2min,35个循环;72°C 3min,获得对应的目的片段。将目的片段与pGL-3载体连接30min后,转化至DH5 α 感受态细胞中,氨苄抗性平板筛选出阳性克隆,送北京擎科生物科技有限公司测序。将测序后返还的质粒重新转化后,进行扩大培养和质粒抽提。质粒抽提方法参照说明书进行。本实验共构建4个黄颡鱼*lal*启动子缺失载体,分别命名为pGL3-554/+51、pGL3-1016/+51、pGL3-1567/+51和pGL3-2052/+51。

利用JASPAR数据库(<http://jaspar.genereg.net/>)预测黄颡鱼*lal*启动子可能的转录因子结合位点。

1.8 细胞转染及双荧光素酶活性检测

HEK293T细胞在10% FBS-DMEM培养基中生长,并置于37°C、5% CO₂的环境中培养。瞬时转染前,将HEK293T细胞以 1.2×10^5 的密度接种于24孔细胞培养板中,培养24h,需达到70%—80%的密度。使用Lipofectamine™ 2000将450 ng构建好的

表2 黄颡鱼*lal* cDNA启动子克隆所用到的引物

Tab. 2 Primers used for *lal* promoter cloning of *P. fulvidraco*

引物Primer	核苷酸序列Sequence (5'—3')
RT-PCR-F	CTGAGCACCGAGATCCAC
RT-PCR-R	TAATAATCCCGCCTTCTC
pGL3-554/+51 F	ctatcgataggtaccgagctcTCCCTCGCCTTGTC CCA
pGL3-554/+51 R	cagtaccggaatgccaagcttTAATAATCCCGCCT TCTCTATTACG
pGL3-1016/+51 F	ctatcgataggtaccgagctcTTCAAATTACAACC AGCCAAAGC
pGL3-1016/+51 R	cagtaccggaatgccaagcttTAATAATCCCGCCT TCTCTATTACG
pGL3-1567/+51 F	ctatcgataggtaccgagctcCACACTTTAATATAAC ATGTACTATACATCACCT
pGL3-1567/+51 R	cagtaccggaatgccaagcttTAATAATCCCGCCT TCTCTATTACG
pGL3-2052/+51 F	ctatcgataggtaccgagctcCTTCCCCTGGAAC ATGCA
pGL3-2052/+51 R	cagtaccggaatgccaagcttTAATAATCCCGCCT TCTCTATTACG

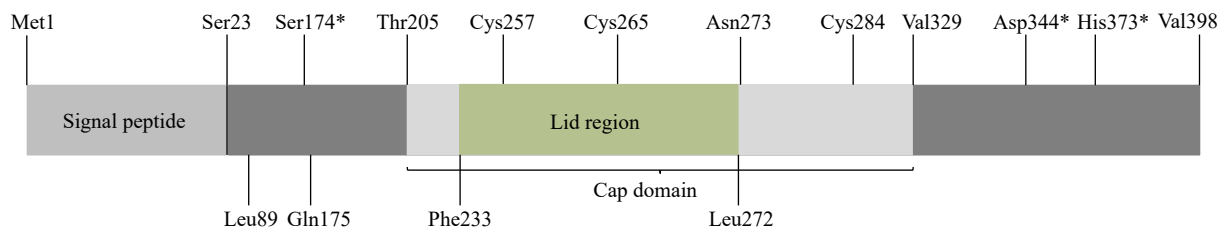


图1 黄颡鱼LAL氨基酸结构示意图

Fig. 1 Structural diagram of LAL amino acids from *P. fulvidraco*

质粒和20 ng pRL-TK(内参质粒)共转染到HEK293T细胞中,阴性对照为pGL3-Basic质粒。4h后,更换含有10% FBS-DMEM培养基。24h后收集细胞,进行双荧光素酶活性检测,检测步骤参照说明书进行。

1.9 数据统计与分析

采用平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)表示结果。统计分析之前,采用Kolmogorov-Smirnov检验所有数据的正态分布性。利用SPSS 19.0软件采用单因素方差分析和Duncan's多重比较评估组织分布数据,采用Student's *t* test评估双荧光活性数据中相邻两组之间的差异。显著性水平为 $P < 0.05$,极显著性水平为 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 黄颡鱼*lal* cDNA的序列特征及进化分析

本研究通过RT-PCR和RACE方法获取*lal*基因的cDNA全长序列,长度为1802 bp,序列分析显示它们的5'非翻译区长度为131 bp,3'非翻译区长度为474 bp,cDNA序列ORF长度为1197 bp,编码398个氨基酸,理论蛋白分子量为45.42 kD,等电点为7.70。黄颡鱼LAL蛋白序列含有一段具有23个氨基酸残基的信号肽、 α/β 水解酶折叠类结构域,5个N-糖基化位点(Asn³⁵-Ile³⁶-Ser³⁷、Asn¹⁰¹-Thr¹⁰²-Ser¹⁰³、Asn²⁷³-Met²⁷⁴-Thr²⁷⁵、Asn³²⁰-Gln³²¹-Ser³²²和Lys¹⁶¹-Thr¹⁶²-Thr¹⁶³)、2个氧阴离子孔(Leu⁸⁹和Gln¹⁷⁵)、1个“帽子”结构域(Thr²⁰⁵-Val³²⁹)和“盖子”结构域(Phe²³³-Leu²⁷²),及催化三元体(Ser¹⁷⁴、Asp³⁴⁴和His³⁷³)和三个半胱氨酸残基(Cys²⁵⁷、Cys²⁶⁵和Cys²⁸⁴)。根据以上主要位点绘制出黄颡鱼LAL的氨基酸结构示意图(图1)。

多重序列比显示,黄颡鱼LAL氨基酸序列与斑点叉尾鲷相应氨基酸序列的相似性为85.64%,与哺乳类的相似性为57.66%—62.77%,其中与人的相似性为60.83%,与大鼠的相似性为57.66%。

在进化树中,哺乳类和两栖类聚为一支,硬骨鱼独立聚为另一支(图2)。同时在硬骨鱼类中,黄颡鱼*lal*多肽与斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)亲缘

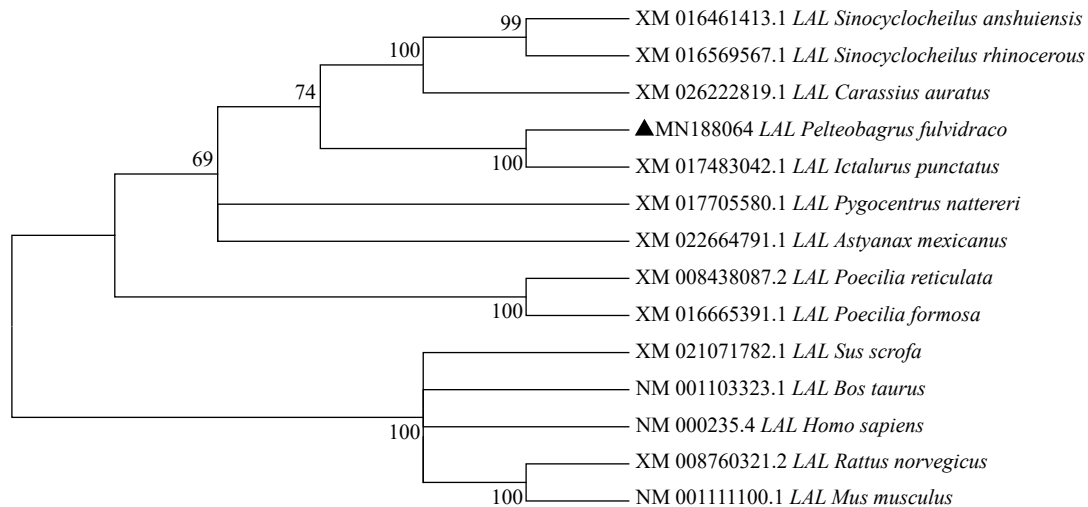


图2 基于NJ法构建的脊椎动物LAL氨基酸序列的系统进化树

Fig. 2 The neighbor-joining phylogenetic tree based on the amino acid sequences from *P. fulvidraco* (▲) and other vertebrate species, using MEGA 5.0 with 1000 bootstrap replicates

节点上数字表示置信度, Bootstrap检验的重复次数为1000次

The numbers on the node indicates the confidence

关系最近,且这两物种与水金线鲃(*Sinocyclocheilus anshuiensis*)、犀角金线鲃(*Sinocyclocheilus rhinoceros*)和金鱼(*Carassius auratus*)聚为一支,其他硬骨鱼类聚为另一支。

2.2 黄颡鱼LAL蛋白三级结构分析

LAL的三维结构主要由3个领域组成,包括 α 螺旋、 β 折叠及转角,3个半胱氨酸残基Cys²⁵⁷、Cys²⁶⁵和Cys²⁸⁴的结合位点在LAL中相互接近(图3)。

2.3 黄颡鱼lal mRNA组织表达分析

黄颡鱼lal基因在多个组织中(心脏、肝脏、脑、脾脏、肾脏、肌肉、肠系膜脂肪、肠道和性腺)均有表达,其中脾脏、肠道和精巢中表达最高,表达量最低的是心脏和大脑(图4)。

2.4 黄颡鱼lal启动子序列及活性分析

本研究克隆得到2103 bp的黄颡鱼lal序列,并将其提交到在线转录因子数据库(JASPAR)进行序列分析。lal的5' cDNA序列的第一个碱基为基因的

转录起始位点,其位置定义为+1。利用JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>)软件预测转录因子结合位点,发现lal启动区存在Sp1、PPAR α 、FOXO1、PPAR γ 、HNF4 α 和TFEB等转录因子结合位点,同时核心启动子结构含有TATA盒和CCAAT盒。

通过5'缺失载体构建、细胞转染及双荧光素酶活性测定,结果显示lal的-1507/-1016区域负调控启动子活性,而-1016 bp/+51 bp区域正调控启动子活性(图5)。

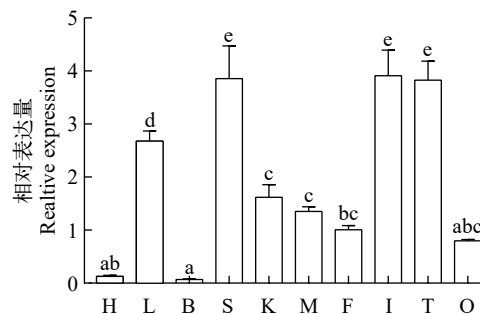


图4 黄颡鱼lal mRNA的组织表达

Fig. 4 The relative mRNA levels of *P. fulvidraco lal* in different tissues

心(H)、肝脏(L)、大脑(B)、脾脏(S)、肾脏(K)、肌肉(M)、脂肪(F)、肠(I)、精巢(T)和卵巢(O);相对mRNA水平通过qPCR定量,数值(平均值 \pm 标准误, $n=3$)用内参基因(β -actin和ubce)标准化;不同字母表示有显著性差异($P<0.05$)

Heart (H), liver (L), brain (B), spleen (S), kidney (K), muscle (M), fat (F), intestine (I), testis (T), ovary (O). The reverse transcription-quantitative PCR (qPCR) data (mean \pm SE, $n=3$) were normalized to β -actin and ubce. Different letters indicated significant difference ($P<0.05$)

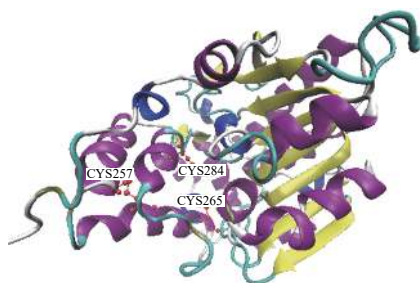


图3 黄颡鱼LAL蛋白三级预测

Fig. 3 The three-dimensional structure prediction of LAL protein from *P. fulvidraco*

3 讨论

3.1 *lal*序列的分子特征及进化分析

本研究获得cDNA全长为1802 bp的黄颡鱼*lal*基因序列, 通过对其蛋白序列分析发现, LAL蛋白质结构拥有保守的 α/β 水解酶折叠类结构域, 一个活性位点(Gly¹⁷²-His¹⁷³-Ser¹⁷⁴-Gln¹⁷⁵-Gly¹⁷⁶), 1个“帽子”结构域(Thr²⁰⁵-Val³²⁹)和“盖子”结构域(Phe²³³-Leu²⁷²), 2个氧阴离子孔(Leu⁸⁹、Gln¹⁷⁵), 催化三元体(Ser¹⁷⁴、Asp³⁴⁴、His³⁷³)和3个半胱氨酸残基(Cys²⁵⁷、Cys²⁶⁵、Cys²⁸⁴), 及5个潜在的N-糖基化位点(Asn³⁵-Ile³⁶-Ser³⁷、Asn¹⁰¹-Thr¹⁰²-Ser¹⁰³、Asn²⁷³-Met²⁷⁴-Thr²⁷⁵、Asn³²⁰-Gln³²¹-Ser³²²、Lys¹⁶¹-Thr¹⁶²-Thr¹⁶³)。除此之外, LAL具有23个残基的信号肽, 能够将该蛋白输送到内质网中进行信号肽裂解和N-糖基化^[5, 19]。在本研究中, 黄颡鱼具有5个N-糖基化位点, 其中除第三个Lys¹⁶¹-Thr¹⁶²-Thr¹⁶³糖基化位点以外, 其余4个在进化上都非常保守^[20]。蛋白质的N-糖基化是一种新生肽链的共翻译或翻译后修饰方式, 对膜和分泌蛋白的折叠和稳定性调节具有重要意义^[21]。其中, 由Asn-X-Thr/Ser组成的N-糖基化位点^[22], 这3种氨基酸与高尔基体中甘露糖-6-磷酸结合, 能够识别出溶酶体表面的特定甘露糖受体^[23]。当N-糖基化位点中Asn²⁷³发生突变时, LAL活性完全丧失^[19], 这表明糖基化位点对LAL的功能、定位及活性至关重要。负责酶活性的催化三元体(Ser¹⁷⁴、Asp³⁴⁴和His³⁷³)有2个位于蛋白质的C-末端区域, 当2个等位基因都存在时, 几乎所有的无义突变都会导致溶酶体酸性脂肪酶缺乏(Lysosomal acid lipase deficiency, LALD)^[24]。在人的LAL蛋白质序列中, 半胱氨酸残基有助于提高LAL对底物的选择活性^[25], 而人与黄颡鱼半胱氨酸数目不同, 可能由于物种的差异性。此外, 我们还发现黄颡鱼LAL氨基酸序列上存在一个“帽子”结构域和“盖子”结构域, Rajamohan等^[26]认为“盖子”结构域打开, LAL活

性被激活, 同时移动“盖子”, 使底物接近催化三元体Ser¹⁷⁴^[16]。Holmes等^[27]认为来自灵长类等近亲物种的LAL半胱氨酸残基显示出高度的序列一致性, 在我们的进化树分析中, 黄颡鱼*lal*与其他硬骨鱼类聚为聚为一只, 哺乳动物聚为另一大分支。

3.2 LAL蛋白三级结构分析

利用已知的脂肪酶结构模型来预测LAL的三级结构, 通过三级同源模型揭示了LAL结构的保守性^[23, 28], 我们的研究也显示LAL和dGL之间具有较高的氨基酸序列相似度(56.84%), 这使得基于dGL结构构建LAL的三级结构模型具有一定的现实意义。同时, Ataya^[23]预测LAL的三级结构中带负电荷的Asp³⁴⁴与His³⁷³和Ser¹⁷⁴形成氢键网络, 激活丝氨酸羟基。该结构隐藏在由Gln¹⁷⁵和Leu⁸⁹主链的NH基团组成的氧阴离子孔中, 它们通过形成2个短氢键为催化反应的过渡态提供了稳定的环境^[29]。

3.3 *lal*序列的组织表达模式

了解基因的生理功能可以通过组织分布模式分析。本研究发现, 黄颡鱼*lal*基因在各组织中均有表达, 但在脾脏、肠道和精巢中高表达, 心脏和大脑表达量最低, 这与其他研究报道相同^[30]。另外Ataya认为^[23]*lal*在精巢中高表达的原因, 可能是由于精巢组织分裂活跃, 精子细胞膜脂双层的产生和降解需要持续进行。溶酶体酸性脂肪酶能为这一过程提供能量。

3.4 *lal*启动子序列及活性分析

RNA聚合酶能够识别真核生物的核心启动子, 并与其结合后, 可调控基因的转录起始和效率, 保证基因转录的准确性和精确性^[31]。通常基因的TATA盒位于转录起始位点的上游-50 bp至-100 bp区域^[32], 并且除虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和斑马鱼(*Danio rerio*)外, 类似TATA的基序(TTTAA)在所有鱼类中都比较保守^[33]。因此识别这些核心启动子是转录起始的一般机制的第一步^[34]。在本

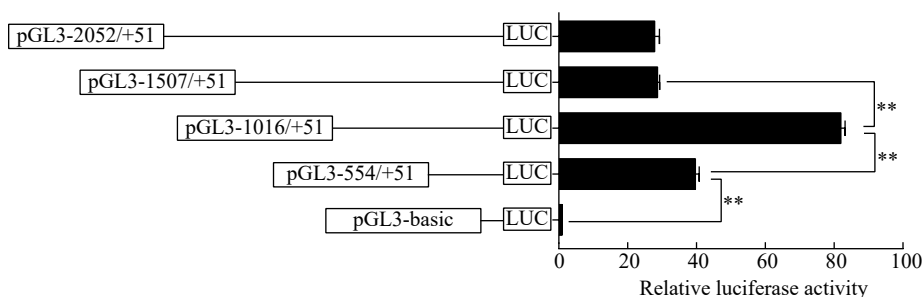


图5 黄颡鱼5' *lal*启动子区启动子活性

Fig. 5 5' unidirectional deletion analysis of the *lal* promoter region for *P. fulvidraco*

**表示极显著差异性, $P < 0.01$

**indicate extremely significant difference, $P < 0.01$

研究中, *lal*核心启动子区存在CCAAT和TATA盒, 分别位于-8 bp至-19 bp, -22 bp至-27 bp。黄颡鱼 *lal*的核心启动子区存在下游核心元件(Downstream core element, DCE)、转录起始元件(Initiator, INR), 从而保证基因转录的正常启动^[31]。

基因的转录也受转录因子结合位点(Transcription factor binding site, TFBS)的调控作用^[35]。根据在线软件预测, 黄颡鱼 *lal*基因的启动子上存在 Sp1(-87 bp/-101 bp)、STAT3(-233 bp/-243 bp)和 PPAR α (-286 bp/-313 bp)结合位点。本研究结果显示5'缺失突变分析结果显示 *lal*的-1016 bp/+51 bp启动子区域正调控启动子活性, 这表明Sp1、STAT3和PPAR α 可能是 *lal*基因启动子可能存在的正调控转录因子。Sp1属于C₂H₂型锌指蛋白家族, 它与富含GC的基序结合调节基因的表达^[36], Sp1能够协同AP-2正调控 *lal*转录表达^[37]。STAT3作为一种转录因子, 正调控CPT 1 α 启动子活性^[38]。PPAR α 是草鱼脂肪组织甘油三酯脂肪酶(Adipose triglyceride lipase, ATGL)基因启动子活性的顺式作用元件^[39]。而LAL作为一种酸性脂肪酶, 将胆固醇酯(CE)和甘油三酯(TG)水解成游离的胆固醇(FC)和脂肪酸(FFA)^[2], 我们可以推测STAT3和PPAR α 也是 *lal*基因启动子活性的顺式作用元件。

本研究结果显示-1507/-1016区域负调控 *lal*启动子活性。在这个区域中, 存在2个FOXO1结合位点(-1066 bp/-1076 bp、-1333 bp/-1343 bp)。FOXO1在调节代谢、应激反应和细胞凋亡中发挥中心作用, 研究表明FOXO1正调控 *lal*的转录^[4]。在本研究中, FOXO1结合位点处于黄颡鱼 *lal*启动子的负调控区域, FOXO1可能是黄颡鱼 *lal*基因潜在的负调控转录因子, 但需要在往后的点突变实验进行论证。另外, 在-2052 bp/-1507 bp区域存在1个PPAR γ (-1755 bp/1774 bp)和1个HNF4 α (-1758 bp/-1772 bp)位点, 值得注意的是PPAR γ 结合位点正包含HNF4 α 结合位点, 这与You等^[36]报道PPAR α 启动子上也存在PPAR位点包含HNF4 α 结果相似。PPAR γ 作为脂质代谢过程中的一种重要转录因子, 对脂肪细胞的分化和脂质储存具有重要作用^[40], 同样HNF4 α 是一种核受体转录因子, 在肝脏特异性基因表达中起关键作用^[41]。本研究也发现 *lal*在肝脏的表达量比较高, 这提示我们PPAR γ 和HNF4 α 能够调节 *lal*的转录表达, 但具体的调节方式有待深入探讨。

4 结论

本研究克隆得到了 *lal*基因的cDNA全长和5'上游启动子序列, 为深入了解该基因的功能提供了基

础。组织表达分析结果表明, *lal*在心、肝脏、脑、脾脏、肾脏、肌肉、肠系膜脂肪、肠及性腺等组织中都有表达, 这表明 *lal*基因对黄颡鱼体内的代谢调控发挥重要的作用。启动子序列及活性分析, 发现 *lal*核心启动区含TATA和CCAAT盒, 存在多个转录因子, 确定了 *lal*启动子的-1507 bp/-1016 bp区域负调控启动子活性, -1016 bp/+51 bp区域正调控启动子活性, 表明不同的转录因子对 *lal*的转录表达有不同作用。此研究为日后深入了解鱼类 *lal*基因在脂质代谢及相关转录水平调控机制等研究提供科学依据。

参考文献:

- [1] Morais S, Bell J G, Robertson D A, *et al.* Protein/lipid ratios in extruded diets for atlantic cod (*Gadus morhua* L.): effects on growth, feed utilisation, muscle composition and liver histology [J]. *Aquaculture*, 2001, **203**(1-2): 101-119.
- [2] Gomaschi M, Bonacina F, Norata G D. Lysosomal acid lipase: from cellular lipid handler to immunometabolic target [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2019, **40**(2): 104-115.
- [3] Zhang H. Lysosomal acid lipase and lipid metabolism: new mechanisms, new questions, and new therapies [J]. *Current Opinion Lipidology*, 2018, **29**(3): 218-223.
- [4] Lettieri Barbato D, Tatulli G, Aquilano K, *et al.* Foxo1 controls lysosomal acid lipase in adipocytes: implication of lipophagy during nutrient restriction and metformin treatment [J]. *Cell Death & Disease*, 2013, **4**(10): e861.
- [5] Ameis D, Merkel M, Eckerskorn C, *et al.* Purification, characterization and molecular cloning of human hepatic lysosomal acid lipase [J]. *European Journal Biochemistry*, 1994, **219**(3): 905-914.
- [6] Dwek R A, Edge C J, Harvey D J, *et al.* Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1993, **62**(1): 65-100.
- [7] Pfeffer S R. Mannose 6-phosphate receptors and their role in targeting proteins to lysosomes [J]. *The Journal of Membrane Biology*, 1988, **103**(1): 7-16.
- [8] Dubland J A, Francis G A. Lysosomal acid lipase: at the crossroads of normal and atherogenic cholesterol metabolism [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2015(3): 3.
- [9] Benevides G N, Miura I K, Person N C, *et al.* Lysosomal acid lipase deficiency in brazilian children: a case series [J]. *Journal de Pediatria*, 2019, **95**(5): 552-558.
- [10] Evans T D, Zhang X, Clark R E, *et al.* Functional characterization of LIPA (lysosomal acid lipase) variants associated with coronary artery disease [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2019, **39**(12): 2480-2491.
- [11] Fisheries Bureau of the Ministry of Agriculture. China

- Fishery Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2019: 1-138. [农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2019: 1-138.]
- [12] Wu K, Zheng J L, Luo Z, *et al.* Carnitine palmitoyltransferase I gene in *Synechogobius hasta*: cloning, mRNA expression and transcriptional regulation by insulin in vitro [J]. *Gene*, 2016, **576**(1): 429-440.
- [13] Zhuo M Q. Functional analysis of PI3Ks and its related signal pathway in insulin regulating lipid metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018: 1-109. [卓梅琴. 黄颡鱼PI3Ks功能解析及其通路在胰岛素调控脂类代谢中的作用机制 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2018: 1-109.]
- [14] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2011, **28**(10): 2731-2739.
- [15] Jones D T, Taylor W R, Thornton J M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences [J]. *Computer Applications in the Biosciences*, 1992, **8**(3): 275-282.
- [16] Roussel A, Miled N, Berti-Dupuis L, *et al.* Crystal structure of the open form of dog gastric lipase in complex with a phosphonate inhibitor [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**(3): 2266-2274.
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.
- [18] Gong G, Dan C, Xiao S, *et al.* Chromosomal-level assembly of yellow catfish genome using third-generation DNA sequencing and Hi-C analysis [J]. *Gigascience*, 2018, **7**(11): 1-9.
- [19] Zschenker O, Bähr C, Hess U F, *et al.* Systematic mutagenesis of potential glycosylation sites of lysosomal acid lipase [J]. *Journal of Biochemistry*, 2005, **137**(3): 387-394.
- [20] Vinje T, Laerdahl J K, Bjune K, *et al.* Characterization of the mechanisms by which missense mutations in the lysosomal acid lipase gene disrupt enzymatic activity [J]. *Human Molecular Genetics*, 2019, **28**(18): 3043-3052.
- [21] Liu Y, Nguyen A, Wolfert R L, *et al.* Enhancing the secretion of recombinant proteins by engineering n-glycosylation sites [J]. *Biotechnology Progress*, 2009, **25**(5): 1468-1475.
- [22] Tan H, Li Y W, Rao J J, *et al.* The expression of three gonadotropin subunits in response to 17-ethynylestradiol in male *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, **39**(6): 1117-1125. [谭号, 李英文, 饶剑军, 等. 乙炔基雌二醇(EE2)对雄性黄颡鱼GtH3个亚基因表达的影响 [J]. *水生生物学报*, 2015, **39**(6): 1117-1125.]
- [23] Ataya F S. Cloning, Phylogenetic analysis and 3D modeling of a putative lysosomal acid lipase from the camel, *Camelus dromedaries* [J]. *Molecules*, 2012, **17**(9): 10399-10413.
- [24] Lohse P, Chahrokh-Zadeh S, Lohse P, *et al.* Human lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase and human gastric lipase: identification of the catalytically active serine, aspartic acid, and histidine residues [J]. *Journal of Lipid Research*, 1997, **38**(5): 892-903.
- [25] Pagani F, Pariyarath R, Stuani C, *et al.* Cysteine residues in human lysosomal acid lipase are involved in selective cholesteryl esterase activity [J]. *Biochemical Journal*, 1997, **326**(1): 265-269.
- [26] Rajamohan F, Reyes A R, Tu M, *et al.* Crystal Structure of human lysosomal acid lipase and its implications in cholesteryl ester storage disease (CESD) [J]. *Journal of Lipid Research*, 2020, **61**(8): 1192-1202.
- [27] Holmes R S, Vandenberg J L, Cox L A. Genomics and proteomics of vertebrate cholesterol ester lipase (LIPA) and cholesterol 25-hydroxylase (CH25H) [J]. *3 Biotech*, 2011, **1**(2): 99-109.
- [28] Kitadokoro K, Tanaka M, Hikima T, *et al.* Crystal structure of pathogenic staphylococcus aureus lipase complex with the anti-obesity drug orlistat [J]. *Scientific Reports*, 2020, **10**(1): 5469.
- [29] Roussel A, Canaan S, Egloff M P, *et al.* Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**(24): 16995-17002.
- [30] Du H, Witte D P, Grabowski G A. Tissue and cellular specific expression of murine lysosomal acid lipase mRNA and protein [J]. *Journal of Lipid Research*, 1996, **37**(5): 937-949.
- [31] Lenhard B, Sandelin A, Carninci P. Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, **13**(4): 233-245.
- [32] Valen E, Sandelin A. Genomic and chromatin signals underlying transcription start-site selection [J]. *Trends in Genetics*, 2011, **27**(11): 475-485.
- [33] De Santis C, Jerry D R. Differential tissue-regulation of myostatin genes in the teleost fish lates calcarifer in response to fasting. Evidence for functional differentiation [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2011, **335**(2): 158-165.
- [34] Goodrich J A, Tjian R. Unexpected roles for core promoter recognition factors in cell-type-specific transcription and gene regulation [J]. *Nature Review Genetics*, 2010, **11**(8): 549-558.
- [35] Chan T M, Leung K S, Lee K H. TFBS identification based on genetic algorithm with combined representations and adaptive post-processing [J]. *Bioinformatics*,

- 2008, **24**(3): 341-349.
- [36] You W J, Fan Y F, Xu Y H, *et al.* Molecular characterization and functional analysis of PPAR α promoter in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Gene*, 2017(627): 106-113.
- [37] Ries S, Büchler C, Langmann T, *et al.* Transcriptional regulation of lysosomal acid lipase in differentiating monocytes is mediated by transcription factors Sp1 and AP-2 [J]. *Journal of Lipid Research*, 1998, **39**(11): 2125-2134.
- [38] Wu K, Tan X Y, Xu Y H, *et al.* Functional analysis of promoters of genes in lipid metabolism and their transcriptional response to STAT3 under leptin signals [J]. *Genes (Basel)*, 2018, **9**(7): 334.
- [39] Sun J. Transcriptinal of ATGL and its role in maintaining adipocyte lipid homeostasis in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) under nutritional restriction [D]. Yangling: Northwest A and F University, 2019: 1-88. [孙健. 营养限制条件下ATGL维持草鱼脂肪细胞脂质代谢稳态的转录调控机制研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019: 1-88.]
- [40] Chinetti G, Fruchart J C, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation [J]. *Inflammation Research*, 2000, **49**(10): 497-505.
- [41] Li J, Ning G, Duncan S A. Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4 α [J]. *Genes Development*, 2000, **14**(4): 464-474.

MOLECULAR CHARACTERIZATION, TISSUE DISTRIBUTION AND TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF LYSOSOMAL ACID LIPASE (*LAL*) IN YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*)

CHEN Fang, ZHONG Chong-Chao, CHEN Shu-Wei, ZHANG Dian-Guang, LÜ Wu-Hong and TAN Xiao-Ying

(Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Nowadays, fatty liver and visceral excessive lipid accumulation are common in cultured fish, which reduces survival rate, growth performance and disease resistance. Yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* is widely distributed in rivers, lakes and other fresh waters in China, and cultured in China and several Asian countries. The fish has relatively high economic value because of delicious taste and abundant nutrition. However, due to intensive culture and improper feeding, excessive fat accumulation in abdominal cavity and liver commonly occurs, which seriously affects the taste and health of yellow catfish. Therefore, the research on fat metabolism of yellow catfish has always been the focus. Lysosomal acid lipase (*LAL*), encoded by *LIPA*, hydrolyzes cholesterylesters (CEs) and triglycerides (TGs) to cholesterol and free fatty acids (FFAs), which are then used for metabolic purposes in the cells. The studies have been conducted to explore *lal* structure in mammals, but were scarce in fish. For this reason, it is important to study the molecular characteristics of *lal* in the regulation of lipid metabolism of yellow catfish. In this study, we analyzed molecular structure, tissue expression, promoter structure and function, and transcriptional regulation of *lal*. The *lal* gene was amplified from yellow catfish by RT-PCR and RACE approaches. The cDNAs of *lal* was 1802 bp, encoding a peptide of 398 amino acid residues, and 5' upstream promoter was 2052 bp in length. The molecular weight of the theoretical protein was 45.42 kDa, the isoelectric point was 7.70, and it had a signal peptide with 23 residues, five glycosylation sites, three cysteines, a catalytic ternary and a "cap" domain and a "lid" region. The amino acid alignment and phylogenetic analysis revealed that *lal* of *P. fulvidraco* was closely related to that of *Ictalurus punctatus*. The *lal* mRNA was expressed in all tested tissues (heart, liver, brain, spleen, kidney, muscle, fat, intestine, testis and ovary), with the highest expression levels in spleen, intestine and testis. Promoter sequence analysis revealed several transcription factor binding sites in *lal* promoter, such as Sp1, STAT3, PPAR α , FOXO1, PPAR γ , and HNF4 α . Studies on promoter activity showed that -1507/-1016 region negatively regulated promoter activity, while -1016/+51 region positively regulated promoter activity. The present study indicated that *lal* mRNA was expressed in multiple high metabolism tissues. The transcription of *lal* was regulated by multiple transcription factors. This study help us to understand the structure and function of *lal*, and lay a foundation for further research on the regulatory mechanism of lipid metabolism in fish.

Key words: *Pelteobagrus fulvidraco*; Lysosomal acid lipase; Molecular characterization; Tissue distribution; Promoter