

军曹鱼 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶的 cDNA 序列克隆与基因表达

许友卿, 郑一民, 丁兆坤

(广西大学 水产科学研究所, 广西 南宁 530004)

摘要: 为了研究海水鱼合成高度不饱和脂肪酸(Highly unsaturated fatty acids, HUFAs)的关键酶, 本研究克隆了军曹鱼(*Rachycentron canadum*)的 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶的部分 cDNA 序列。根据 GenBank 已公布的其他鱼类的 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶 cDNA 序列进行分析, 设计了一对用于 PCR 扩增军曹鱼的 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶基因保守序列的引物; 然后以军曹鱼肝总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 的方法扩增出一段长度为 743 bp 的片段, 该片段经纯化后, 连接至 pMD18-T 载体上进行测序。结果显示, 该片段与欧洲狼鲈(*Dicentrarchus labrax*) $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶基因的覆盖区同源性为 90.4%, 该蛋白结构含有 2 个组氨酸保守区(HDFGH 和 HFQHH)和 2 个跨膜结构域, 具有典型的 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶结构特点。通过荧光定量 PCR(Real-time quantity PCR, RTQ-PCR)检测该基因在军曹鱼幼鱼不同组织中的表达量, 发现 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶基因在军曹鱼脑的表达量最高; 其次是肝; 再其次是心、肠、脾、肾、鳃; 而肌肉和皮肤的表达量相对较低, 在脂肪组织中没有检测到 $\Delta 6$ 去饱和酶基因的表达。结论为, 军曹鱼具有合成 HUFAs 的关键酶— $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶, 在其所有组织中以脑之含量最多。[中国水产科学, 2010,17(6): 1183-1191]

关键词: 高度不饱和脂肪酸; $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶; 基因克隆; 基因表达; 荧光定量 PCR; 军曹鱼
中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2010)06-1183-09

军曹鱼(*Rachycentron canadum*)是暖水性与肉食性海洋鱼类, 广泛分布于热带和亚热带。军曹鱼肉质好, 是可供蒸煮、熏制或生鱼片食用的全球新海洋食品, 具有巨大的国际市场潜力, 而且该鱼抗病力强、存活率高, 生长速度快, 因而被认为是当前人工网箱养殖的理想鱼种^[1-2]。在开展军曹鱼商业化人工养殖过程中, 营养饲料是关键的制约因素之一, 因此有必要研究军曹鱼的基础营养、生理和生化学^[3-4]。

鱼类必需营养素中的高度不饱和脂肪酸(HUFAs), 特别是二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acids, DHA)和二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA), 在维持机体的正常机能、促进生长、发育、繁殖和提高成活率等方面发挥重要的生理

作用。已知淡水鱼类可以通过 n-6 和/或 n-3 途径去饱和及碳链延长作用, 分别把植物产品中的 18:3n-3 和 18:2n-6 脂肪酸转化为长链 HUFAs。在这 2 个途径中, $\Delta 6$ 去饱和酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶和碳链延长酶是合成的关键酶^[5-6]。延长酶普遍存在于多数淡水鱼和海水鱼中^[7-9], 但是, 至今只从少数几种鱼类克隆了脂肪酸去饱和酶 cDNA^[10-12], 例如从淡水斑马鱼(*Danio rerio*)克隆了 $\Delta 5$ 和 $\Delta 6$ 双功能去饱和酶^[13], 从大西洋鲑(*Salmo salar*)克隆了单个 $\Delta 5$ 去饱和酶和 $\Delta 6$ 去饱和酶^[14]。海水鱼是人类获取 EPA 和 DHA 等 HUFAs 的最重要来源^[15-16], 野生海水鱼可以从摄入的藻类、甲壳类等食物获取 EPA 和 DHA 等 HUFAs, 但是, 能否自行合成高度不饱和脂肪酸, 还是一个探究中的问题^[17-20]。

收稿日期: 2009-11-02; 修订日期: 2009-11-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571448); NSFC-RSE 国际合作项目(30711130272); 高校博士点基金项目(20060560001); 广西省自然科学基金项目(桂科自 0728014, 桂科自 0728011); 广西大学重大项目(CC150008, CC150009).

作者简介: 许友卿(1956-), 女, 教授, 博士, 主要研究鱼类营养生理生化与分子生物学. E-mail: youqing.xu@hotmail.com

通讯作者: 丁兆坤, 男, 教授, 博士生导师, 主要研究鱼类营养生理生化和分子生物学. E-mail: ZhaokunD@hotmail.com

为了探讨军曹鱼合成 HUFAs 的可能性及其机制, 本研究中克隆了军曹鱼 $\Delta 6$ 去饱和酶部分 cDNA 序列并分析了该基因在军曹鱼幼鱼 11 种组织中的表达量。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

TRIZOL[®] Reagent(For research use)购自美国 Invitrogen 公司。M-MLV Reverse Transcriptase(200 U/ mL, For research use)、Oligo(dT)₁₅ (0.5 μ g/ μ L, For research use)、Go Taq[®] Flexi DNA Polymerase (5 U/ μ L, For laboratory use)均购自 promega 公司。PMD[™] 18-T Vector(50 ng/ μ L, For research use)、SYBR premix Ex Taq II Kit(50 μ L /200 次, For research use)系宝生物工程(大连)有限公司产品。胶回收试剂盒(Watson's Gel Extraction Kit w5211)购自上海华舜生物工程有限公司。质粒纯化试剂盒(Biospin plasmid DNA extraction kit)购自 BioFlux 公司。PCR 扩增仪(T-Gradient)是德国 Bio-Metra 公司产品。核酸蛋白分析仪(DU800 型)和 RTQ- PCR 扩增仪(CFB-3220 Opticon[™] 2 system)分别是美国 Backman 和 Bio-Rad 公司产品。

1.2 军曹鱼

军曹鱼幼鱼来自广东省湛江市流沙镇水产公司人工养殖场。随机取军曹鱼幼鱼 20 尾(45 日龄, 体质量 16~18 g)。分别解剖鱼体后, 迅速取出肝、肠、心、脾、脑、皮肤、脂肪、鳃、红肌、白肌、肾 11 种组织, 编号并称重, 立即放入液氮中速冻, 转存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.3 军曹鱼 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶部分 cDNA 序列的克隆

从-80 $^{\circ}$ C 冰箱取 6 号军曹鱼肝脏(L)约 150 mg, 在液氮条件下, 迅速用研钵将组织样品研碎。将粉末样品迅速转入已预冷并处于冰中的玻璃匀浆器中充分匀浆后, 按照 TRIZOL[®] Reagent 使用说明提取军曹鱼幼鱼肝的总 RNA。通过核酸蛋白分析仪检测其浓度和纯度, 并在 MMLV 反转录酶和引物 Oligo(dT)₁₅ 作用下, 反转录合成首链 cDNA。在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数

据库中搜索已克隆的其他鱼类的 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶基因保守序列、应用 primer 5.0, Oligo 6.0 序列分析软件进行对比分析, 找到保守区域序列, 并根据保守区序列设计一对引物用于 PCR 扩增军曹鱼 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶基因保守区 cDNA。其中, 正向引物: 5' GAG CCC AGC CAG GAC CG AA 3'; 反向引物: 5' ATC GGC AGA TGA TTC ATC TG 3'。PCR 扩增反应通过 Taq DNA 聚合酶作用完成, 并设置好如下 PCR 扩增程序: 预变性 95 $^{\circ}$ C, 2 min; 变性 95 $^{\circ}$ C, 30 s; 退火 56 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 1 min 共 32 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C, 10 min 延伸。用胶回收试剂盒将获得的 PCR 产物纯化回收, 并连入 pMD18-T Vector 获得含目的片段的重组质粒; 用 Biospin plasmid DNA extraction kit 将重组质粒纯化并请上海生物工程有限公司进行序列测定。用软件 vector kit 7.0 把测得的军曹鱼 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶氨基酸序列和其他鱼类该酶氨基酸序列进行同源性比对。

1.4 军曹鱼幼鱼 11 种组织总 RNA 的提取和实时荧光定量 PCR

分别称取 6 号军曹鱼的肝(Liver, L)、脑(Brain, B)、心脏(Heart, H)、肾(Kidney, K)、鳃(Gill, G)、小肠(Intestine, I)、脾(Spleen, SP)、脂肪(Adipose, AD)、皮肤(Skin, SK)、红肌(Red muscle, RM)、白肌(White muscle, WM)各约 100 mg(其中脂肪组织质量约 50 mg), 并分别抽提各组织的总 RNA。然后每种组织以 5 μ g 总 RNA 为模板, 以 Oligo(dT)₁₅ 为引物, 在 MMLV 反转录酶的作用下进行反转录反应。反应结束后, 即获得军曹鱼各组织的第一链 cDNA 样品。通过实时荧光定量 PCR 反应, 检测 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶基因在不同组织中的表达。根据上述已克隆的军曹鱼 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶部分 cDNA 序列设计定量 PCR 引物, 前向引物: 5' TCT CTG TCT TCA AGA AGT CC 3'; 反向引物: 5' CTC CAA CAA CAA AGA TGC TC 3'。PCR 产物为 174 bp, PCR 产物被连入 pMD18-T Vector; 用核酸蛋白分析仪检测含目的基因片段的重组质粒浓度, 并连续稀释 5 个浓度梯度得到 1 个已知拷贝数的标准曲线。用 SYBR premix Ex Taq II 试剂盒, 将各组织的 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶 cDNA 样

品分别和 5 个浓度的标准品同批进行 SYBR GREEN-I 实时荧光定量 PCR 反应, 每个反应重复 3 次。在荧光定量 PCR 仪(CFB-3220 Opticon™ 2 system, 美国 Bio-Rad 公司)设置如下 PCR 扩增程序: 预变性 95℃, 15 s; 变性 95℃, 5 s; 退火 56℃, 20 s; 72℃, 15 s; 共 39 个循环; 最后 72℃ 30 s 延伸。反应后, 根据线性标准曲线方程, 计算每个样品目的基因的绝对拷贝数。

2 结果与分析

2.1 军曹鱼 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶部分 cDNA 序列分析

克隆得到军曹鱼 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶部分 cDNA 序列, 大小为 743 bp, 编码 247 个氨基酸。该氨基酸序列片段与其他鱼类的 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶氨基酸序列非常相似, 包含 2 个组氨酸富集区(HDFGH, HFQHH)和 2 个跨膜结构域(图 1)。同

军曹鱼 <i>Rachycentron canadum</i>	(1)	EPSQDRNKNAAI IQDFHALRAQA ESEGLFQTQPLFFCLHGHIVLLEALA
欧洲海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	(99)	EP SQDRNKNAAI IQDFYTLRAQA ESEGLFKAQPLFFCLHGHIL LLEALA
大西洋鳕 <i>Gadus morhus</i>	(101)	EPSQDRNKNAAV VEDFQALRTRAEGLGLFQAQPLFFCLHGHILLLELLA
罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	(99)	EPSQDRDKNAAI IQDFETLRAQVEKRGLFRAQPLFFFLHL SHILLLEALG
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	(108)	EP SQDHGKNAVL VQDFQALNRVVEREGLLRARPLFFSL YLGHILLLEALA
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	(99)	EPSQDRNKNAAV IQDFHTLRAQA ESDGLFRAQPLFFCLHGHILLLEALA
军曹鱼 <i>Rachycentron canadum</i>	(51)	WLMIWHWGTNWIL TLLCAVMLATAQSQAGWLQ HDFGH LSVFKKSSWNHLL
欧洲海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	(149)	WLI IWL WGTSWTL TFLC SIMLATAQSQAGWLQ HDFGH LSVFKKSSWNHML
大西洋鳕 <i>Gadus morhus</i>	(151)	WMSVWL WGTGWR TLLC SFILA VAQAQAGWLQ HDFGH LSVFKL SRWNHIF
罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	(149)	WLTWVMWGTGWIQT LWC SVFLATAQAQAGWLQ HDFGH LSVFKKSSWNHLA
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	(158)	LGLLWV WGTSWSL TLLC SLMLATSQSQAGWLQ HDYGH LSVCKKSSWNHVL
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	(149)	WLI IWL WGTSWTL TFLI SIILATAQTAQAGWLQ HDFGH LSVFKKSSWNHIL
军曹鱼 <i>Rachycentron canadum</i>	(101)	HKFAIGHLKGAS ANWWNHRH HFQHH AKPNIFSKDPDVNML SIFVVGATQPV
欧洲海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	(199)	HKFVIGHLKGAS ANWWNHRH HFQHH AKPNIFSKDPDVNML HIFVVGATQPV
大西洋鳕 <i>Gadus morhus</i>	(201)	HKF I IGH LKGAS GNWWNHRH HFQHH AKPNVFSKDPDVNML HVFVVGDIQPV
罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	(199)	HKF V IGH LKGAS SNWWNHRH RHH AKPNIFIKDPDINTLHLFVLGRTPQV
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	(208)	HKFVIGHLKGAS ANWWNHRH HFQHH AKPNVLSKDPDVNMLHVFVLGDRQPV
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	(199)	HKFVIGHLKGAS ANWWNHRH HFQHH AKPNIFSKDPDVNMLHIFVLGDTQPV
军曹鱼 <i>Rachycentron canadum</i>	(151)	EYGIKKIKHMPYHRQH QYFFLVGPPLLIPVVFHTIQIMHTMISRHDWVDLV
欧洲海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	(249)	EYGIKKIKYMPYHHQH QYFLLVGPPLLIPVVFHTIQIIRTMISRSDWVDLA
大西洋鳕 <i>Gadus morhus</i>	(251)	EYGIKKIKYMPYHHQH QYFFLVGPPLLIPVVFHTIQILRAMFSRRDWVDLA
罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	(249)	EYGIKKIKHMPYNRQH H YFFLVGPPLIIPVVFNIHVMTMISRSDWVDLA
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	(258)	EYGIKKLYMPYHHQH QYFFLIGPPLLIPVVFHTIQIFQTMFSQRNWDVLA
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	(249)	EYGIKKIKYLPYHHQH QYFLLVGPPLLIPVVFHTIQIIRTMISRHDWVDLA
军曹鱼 <i>Rachycentron canadum</i>	(201)	WSMSYLYRYFCYVPL YGLFGSLALISFVRFLESHW
欧洲海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	(299)	WSMSYLYRYLCCYVPLYGLFGSLALISFVRFLESHW
大西洋鳕 <i>Gadus morhus</i>	(301)	WSMSYLYRYFCCYAPFYGLLGSVALISFVRFLESHW
罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	(299)	WFISFYLRFFSCYLPYGL VGSVLISIVRFLESHW
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	(308)	WSMTFYLRFFCSYYPFGFGGSVALITFVRFLESHW
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	(299)	WSMSYLYRYLCCYVPLYGLFGSVALISFVRFLESHW

图 1 用 Vector NIT 7.0 对军曹鱼和其他鱼类 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶氨基酸序列的同源性比对

黑框表示 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶的跨膜结构; 粗体表示两个组氨酸的富集区域; 阴影部分表示: 军曹鱼、欧洲海鲈、大西洋鲑、罗非鱼和金头鲷之间具有相同或相似的氨基酸残基。

Fig. 1 Comparison between the predicted amino acid sequences of delta 6 desaturase from cobia and others. Putative trans-membrane regions are shown in black box, and two putative histidine-rich domains are in bold. Shadows mean the common amino acid residues among *R. canadum*, *D. labrax*, *S. salar*, *O. niloticus* and *S. aurata*.

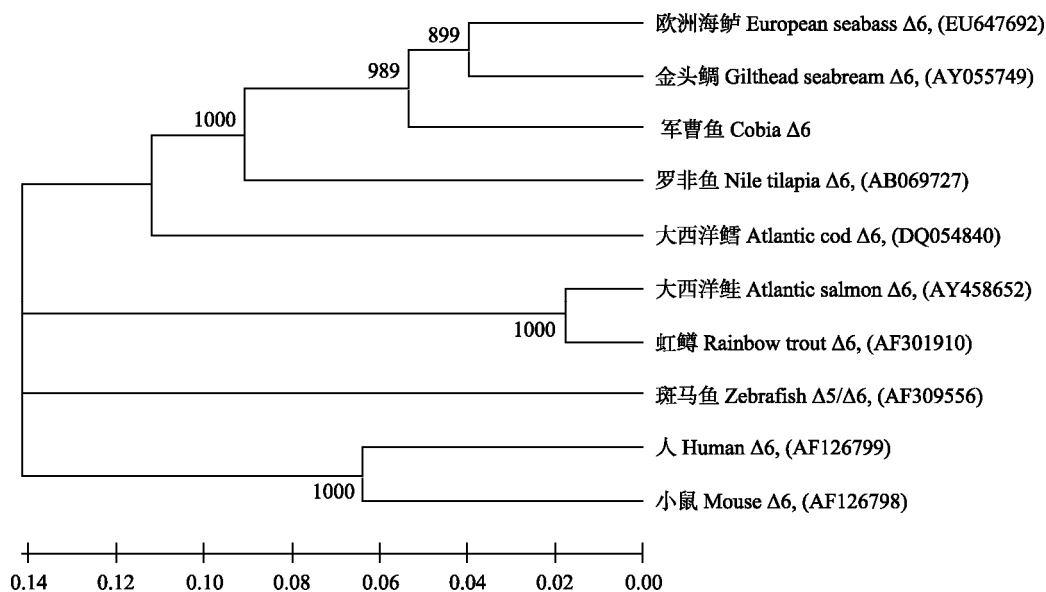


图 2 军曹鱼、其他部分鱼类、人和小鼠的 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶系统进化关系图

使用 CLUSTAL X 和 MEGA 4.0 软件, 采用 Neighbour Joining 方法^[21]构建该进化树. 各节点的数字通过 1 000 次自展重复计算后获得, 代表进化分枝的支持率.

Fig. 2 Phylogenetic tree of delta 6 desaturases from cobia and other fish species

The tree was constructed in CLUSTAL X and MEGA 4.0, using the Neighbour Joining method^[21]. The numbers represent the frequencies with which the tree topology presented here was replicated after 1 000 bootstrap iterations.

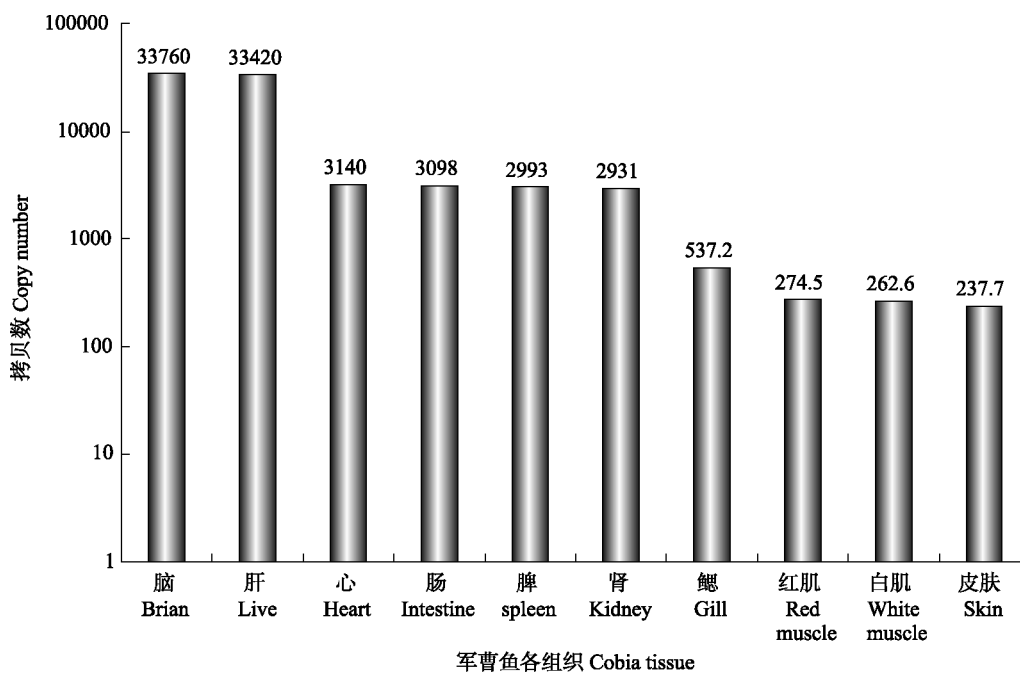


图 3 $\Delta 6$ 去饱和酶基因在军曹鱼 11 种组织中的绝对拷贝数(拷贝数/5ng 总 RNA)

Fig. 3 Distribution of delta 6 desaturase gene in 11 tissues of cobia (copy number, 5ng total RNA)

洲海鲈及金头鲷的 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶进化关系最近; 其次是罗非鱼、大西洋鳕以及大西洋鲑; 但是与斑马鱼、人、和小鼠的进化关系较远。

所克隆的军曹鱼 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶基因片段具有典型的脂肪酸去饱和酶结构特性, 包含 2 个组氨酸富集区(HDFGH, HFQHH)和 2 个跨膜结

构域(图 1)。结果与已有的报道一致,即 $\Delta 6$ 去饱和酶的 N 端和 C 端缺乏明显的同源性,而中间序列则相对保守,特征性地由 8 个保守的组氨酸残基构成 3 个保守的组氨酸富集区(histidine-rich region): *His I*、*His II*、*His III*或用结构简式表示为 $HX_{(3-4)}H$ 、 $HX_{(2-3)}HH$ 、 $(H/Q)X_{(2-3)}HH$ ^[24]。3 个保守的组氨酸富集区是维持酶活性所必需的,如果把玻璃苣 $\Delta 6$ -脂肪酸去饱和酶和 $\Delta 8$ -鞘脂去饱和酶进行部分重组,当 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶 *His I* 和 *His II* 区的氨基端和只有 *His III* 区的 $\Delta 8$ 鞘脂脱氢酶羧基端重组时,得到的重组酶丧失催化 C_{18} 脂肪酸的去饱和功能,而只能催化棕榈酸(Hexadecanoic acid, $C_{16:1}$)和肉豆蔻酸(Myristoleic acid, $C_{14:1}$)脱氢,并认为 *His I* 和 *His II* 区与酶-底物结合位点的形成有关,而 3 个保守的组氨酸富集区和 1 个 Fe^{2+} 结合形成催化活性中心,另外还有 2 个长的疏水区跨膜 4 次^[25]。

3.2 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶基因在军曹鱼 11 种组织中的表达

在本研究中,发现军曹鱼幼鱼 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶基因在脑中表达量最高(图 3),表明 HUFAs 在神经组织中具有重要的作用,在幼鱼的快速生长发育期尤为重要。这个结果与其他学者的研究报告基本一致。Tocher 等^[16]报道, $\Delta 6$ 去饱和酶基因在大西洋鳕脑中的表达量最高,其次是肝、肾和肠。Seiliez 等^[11]对虹鳟的研究也发现, $\Delta 6$ 去饱和酶基因在脑、肝、肠等组织中表达量较高。Tocher 等^[26]的研究表明,在幼鱼生长发育的关键阶段,鱼体的神经组织中含高浓度 DHA,特别在脑和视网膜中, n-3HUFAs 和 DHA 总含量高于其他非神经组织。由于幼鱼处于快速生长发育阶段,代谢十分旺盛,脑中需要合成或摄取大量的 HUFAs,以维持其正常的功能和代谢^[27]。如果食物中 n-3 脂肪酸持续缺乏,会降低人脑和视网膜中 $C_{22:6}$ 含量^[28],导致视杆细胞外节膜盘的改变^[30],视力下降^[31],学习能力降低^[32]。Bourre 等^[30]的研究发现,在鼠的早期生长发育阶段,脑中需要大量的 HUFAs 维持脑的正常发育,此时, $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶具有很高的活性。脑中 HUFAs 主要包括

20:4n-6(AA)、20:5n-3(EPA)和 22:6n-3(DHA),在人的脑磷脂中,超过 30%的脂肪酸是 EPA 和 DHA^[33]。在视网膜视杆外段膜盘和感光细胞中, DHA 约占总脂肪酸含量的 60%,并对维持神经元和视网膜正常功能起至关重要作用^[34]。

在军曹鱼脂肪组织中,作者没有检测到 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶基因的表达(图 3)。野生军曹鱼的天然食物中富含 HUFAs,食物中的 HUFAs 可能抑制了其体内参与葡萄糖代谢和脂肪酸合成酶的合成量来抑制脂肪的合成。已有研究表明,多不饱和脂肪酸(Poly unsaturated fatty acids, PUFA)可以通过抑制肝脏中参与葡萄糖代谢和脂肪酸合成酶(如:葡萄糖激酶、丙酮酸激酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、柠檬酸裂解酶、乙酰 COA 羧化酶、脂肪酸合成酶、硬脂酰 COA 脱氢酶和 $\Delta 6$ 去饱和酶及 $\Delta 5$ 去饱和酶)的合成量来抑制肝脏中脂肪的合成^[35]。如果给野生型和转基因型肥胖大鼠饲喂亚油酸时其肝脏脂肪合成能力均受到抑制^[36-37]。多不饱和脂肪酸甚至可以通过调节胰岛素和碳水化合物来抑制脂肪前体物质的生成,可见脂肪酸去饱和酶对胰岛素的依赖性较大^[38]。

军曹鱼和大西洋鲑、金头鲷、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)一样同属于广盐性海洋鱼类,它们能在含盐浓度范围很宽的环境下生存。而不同生活环境盐度对鱼类体内脂肪酸、n-3/n-6 脂肪酸比值都会产生影响,例如淡水鱼的 n-3 HUFAs(包括 EPA 和 DHA)含量明显低于海水鱼^[39]。Li 等^[40]研究发现,在低盐(盐度 10)海水环境中,黄斑蓝子鱼(*Siganus oramin*) $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶 mRNA 的表达量约为高盐(盐度 32)海水环境表达量的 1.5 倍,表明低盐可促进 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶 mRNA 的表达。换言之,低盐环境可能激活或加强鱼体 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶和 $\Delta 5$ 脂肪酸去饱和酶的活性,促进转化 LA 和 LNA 为 HUFAs。有研究认为,海水鱼合成 HUFAs 的能力有限,是因为缺乏 $\Delta 5$ 脂肪酸去饱和酶的缘故^[16,41]。而广盐性鱼类,如大西洋鲑、金头鲷和大菱鲆却具有 $\Delta 5$ 脂肪酸去饱和酶活性^[13,16,39],因此可能具有合成 HUFAs 的能力,但此结论仍需进一步研究证实。

4 结论

(1) 军曹鱼 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶部分保守序列长 743 bp, 编码 247 个氨基酸, 与已克隆的其他鱼种同种酶的 cDNA 序列具有较高同源性, 其中与狼鲈的同源性最高, 为 87%; 该序列具有典型的脂肪酸去饱和酶的结构特性。

(2) $\Delta 6$ 去饱和酶基因在军曹鱼 10 种组织中均有表达, 其中脑、肝的表达量相对较高, 其次是心、肠、脾、肾、鳃, 而在肌肉和皮肤的表达量相对较低; 在脂肪组织中没有检测到 $\Delta 6$ 去饱和酶基因的表达。

(3) $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶是合成 HPFAs 的关键酶。军曹鱼具有较高的 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶, 并有 $\Delta 5$ 脂肪酸去饱和酶的活性^[3], 可能具有合成 HUFAs 的能力。

参考文献:

- [1] Holt G J, Faulk C K, Schwarz M H. A review of the larviculture of cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish[J]. *Aquaculture*, 2007, 268: 181–187.
- [2] Liao I C, Huang T S, Tsai W S, et al. Cobia culture in Taiwan: current status and problems[J]. *Aquaculture*, 2004, 237: 155–165.
- [3] Zheng X Z, Ding Z K, Xu Y Q, et al. Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: Characterisation of cDNAs of fatty acyl $\Delta 6$ desaturase and elov15 elongase of cobia(*Rachycentron canadum*)[J]. *Aquaculture*, 2009, 290: 122–131.
- [4] Xu Y, Ding Z. Studies on the culture and assorted feed of cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Fish Sci*, 2006, 25(1): 34–36.
- [5] Cook H W. Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryote [M]. Vance D E, Vance J E. *Biochemistry of lipids, Lipoproteins and membranes*. Amsterdam: Elsevier, 1996: 129–152.
- [6] Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1486(2–3): 219–231.
- [7] Agaba M, Tocher D R, Dickson C, et al. A zebrafish cDNA encoding a multifunctional enzyme involved in the elongation of polyunsaturated, monounsaturated and saturated fatty acids[J]. *Mar Biotechnol*, 2004, 6: 251–261.
- [8] Agaba M K, Tocher D R, Zheng X, et al. Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases from marine and freshwater teleost fish[J]. *Comp Biochem Physiol*, 2005, 142B: 342–352.
- [9] Hastings N, Agaba M K, Tocher D R, et al. Molecular cloning and functional characterization of fatty acyl desaturase and elongase cDNAs involved in the production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from α -linolenic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Mar Biotechnol*, 2005, 6: 463–474.
- [10] Seiliez I, Panserat S, Kaushik S, et al. Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a $\Delta 6$ -desaturase-like enzyme in rainbow trout [J]. *Comp Biochem Physiol Part B*, 2001, 130: 83–93.
- [11] Seiliez I, Panserat S, Corraze G, et al. Cloning and nutritional regulation of a $\Delta 6$ -desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*)[J]. *Comp Biochem Physiol Part B*, 2003, 135: 449–460.
- [12] Zheng X, Seiliez I, Hastings N, et al. Characterization and comparison of fatty acyl $\Delta 6$ desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species [J]. *Comp Biochem Physiol Part B*, 2004, 139: 269–279.
- [13] Hastings N, Agaba M, Tocher D R, et al. A vertebrate fatty acid desaturase with $\Delta 5$ and $\Delta 6$ activities[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 14304–14309.
- [14] Zheng X Z, Tocher D R, Dickson C A. Highly unsaturated fatty acid synthesis in vertebrates: new insights with the cloning and characterization of a $\Delta 6$ -desaturase of Atlantic salmon[J]. *Lipids*, 2005, 40: 13–24.
- [15] 许友卿, 丁兆坤. 用基因工程方法研制廿二碳六烯酸[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(5): 22–25.
- [16] Tocher D R, Zheng X Z, Schlegel C, et al. Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine Fish: cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl $\Delta 6$ -desaturase of Atlantic Cod (*Gadus morhua* L)[J]. *Lipids*, 2006, 41: 1003–1016.
- [17] 许友卿, 张海柱, 丁兆坤. 二十二碳六烯酸和二十碳五烯酸研究进展(1)[J]. *生物学通报*, 2007, 42(11): 13–15.
- [18] 许友卿, 张海柱, 丁兆坤. 二十二碳六烯酸和二十碳五烯酸研究进展(2)[J]. *生物学通报*, 2007, 42(12): 3–5.
- [19] 许友卿, 张海柱, 丁兆坤. 二十二碳六烯酸和二十碳五烯酸的代谢研究[J]. *水产科学*, 2007, 26(10): 580–583.
- [20] 丁兆坤, 刘亮, 许友卿. 二十碳四烯酸研究[J]. *水产科学*, 2007, 26(12): 684–688.
- [21] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method. A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406–425.
- [22] Sprecher H, Luthria D L, Mohammed B S, et al.

- Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids[J]. *J Lipid Res*, 1995, 36(12): 2471–2477.
- [23] 丁兆坤, 麻艳群, 许友卿. 合成高度不饱和脂肪酸去饱和酶的分子生物学研究 I. 结构与功能[J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(6s): 196–200.
- [24] 许友卿, 郑一民, 丁兆坤. 合成高度不饱和脂肪酸 $\Delta 6$ 去饱和酶研究的回顾与前瞻[J]. *饲料工业*, 2008, 29(14): 42–44.
- [25] Libisch B, Michaelson L V, Lewis M J, et al. Chimeras of $\Delta 6$ -fatty acid desaturase and $\Delta 8$ -sphingolipid desaturases[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279(3): 779–785.
- [26] Tocher D R, Mourente G, Sargent J R. Metabolism of [1-14C]docosahexaenoate (22 : 6n-3), [1-14C] eicosapentaenoate (20 : 5n-3) and [1-14C]linolenate (18 : 3n-3) in brain cells from juvenile turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Lipids*, 1992, 27(7): 494–499.
- [27] Naughton J M. Supply of polyenoic fatty acids to the mammalian brain: the ease of conversion of the short-chain essential fatty acids to their longer chain polyunsaturated metabolites in liver, brain, placenta and blood[J]. *Int J Biochem*, 1981, 13(1): 21–32.
- [28] Neuringer M, Connor W E, Lin D S, et al. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(11): 4021–4025.
- [29] Mourente G, Tocher D R, Sargent J R. Specific accumulation of docosahexaenoic acid 22:6n-3 in brain lipids during development of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L[J]. *Lipids*, 1991, 26: 871–877.
- [30] Bourre J M, Piciotti M, Dumont O. Delta 6 desaturase in brain and liver during development and aging[J]. *Lipids*, 1990, 25(6): 354–356.
- [31] Neuringer M, Connor W E, Van Petten C, et al. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and visual loss in infant rhesus monkeys[J]. *J Clin Invest*, 1984, 73(1): 272–276.
- [32] Lamptey M S, Walker B L. Learning behavior and brain lipid composition in rats subjected to essential fatty acid deficiency during gestation, lactation and growth[J]. *J Nutr*, 1978, 108(3): 358–367.
- [33] Crawford M A, Costeloe K, Ghebremeskel K, et al. Are deficits of arachidonic and docosahexaenoic acids responsible for the neural and vascular complications of preterm babies?[J]. *Am J Clin Nutr*, 1997, 66(4): 1032S–1041S.
- [34] Giusto N M, Pasquaré S J, Salvador G A, et al. Lipid metabolism in vertebrate retinal rod outer segments[J]. *Prog Lipid Res*, 2000, 39(4): 315–391.
- [35] Jump D B, Clarke S D. Regulation of gene expression by dietary fat annual review of nutrition[J]. *Annu Rev Nutr*, 1999, 19: 63–90.
- [36] Gossett R E, Frolov A A, Roths J B, et al. Acyl-CoA binding proteins: multiplicity and function[J]. *Lipids*, 1996, 31: 895–918.
- [37] Hwang D. Fatty acids and immune responses a new perspective in searching for clues to mechanism[J]. *Annu Rev Nutr*, 2000, 20: 431–456.
- [38] 栾广春, 王加启, 卜登攀, 等. 多不饱和脂肪酸对机体脂肪代谢基因表达调控研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(12): 5–8.
- [39] Steffens W. Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans[J]. *Aquaculture*, 1997, 151(1–4): 97–119.
- [40] Li Y Y, Hu C B, Zheng Y J, et al. The effects of dietary fatty acids on liver fatty acid composition and $\Delta 6$ -desaturase expression differ with ambient salinities in *Siganus canaliculatus*[J]. *Comp Biochem Physiol*, 2008, Part B 151: 183–190.
- [41] Tocher D R, Ghioni C. Fatty acid metabolism in marine fish: Low activity of $\Delta 5$ desaturation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cells[J]. *Lipids*, 1999, 34, 433–434.

Cloning and gene expression of delta 6 fatty acid desaturase cDNA of cobia (*Rachycentron canadum*)

XU Youqing, ZHENG Yimin, DING Zhaokun

(Institute for Fishery Sciences, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: N-3 highly unsaturated fatty acids (HUFAs), eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acids (DHA), are particularly important in the physiological procedures of human beings and animals. However, human and animals including some marine fish species can not synthesize HUFAs from linoleic and linolenic acids since they have no or less activity of delta 6 nor 5 fatty acid desaturases and elongase that are a key for the synthesis of HUFAs. Therefore, they have to ingest HUFAs from their diets for the normal growth and development. Actually, this is a question that should be further explored in some marine fishes.

Cobia (*Rachycentron canadum*) is a worldwide marine fish in tropical, subtropical and warm temperate seas. Cobia is an excellent candidate for aquaculture because of its fitting to wide salty, high resistance to diseases, and rapid growth, reaching 6–10 kg in 12–14 months. Marine fish is main source of HUFAs, DHA and EPA for human beings. With the decline of fishing and rapidly expanding aquaculture, feed-grade fishing has reached sustainable limits. A developing cobia commercial fishery needs to solve sustainable developing problems of artificial nutrition feed, using plant products to replace fish products, in which the basis of nutrition, physiology and biochemistry of cobia is necessary to study. Accordingly, delta 6 fatty acid desaturase, a key enzyme in the synthesis of HUFAs in cobia was studied in our experiments. Delta 6 fatty acid desaturase cDNA of cobia (*Rachycentron canadum*) was cloned and sequenced as well as its expression in different tissues was determined. Total RNA was extracted from the liver of juvenile cobia and amplified using real time-PCR (RT-PCR). The amplified product was a fragment with 743bp. The sequence of the fragment of delta 6 fatty acid desaturase from cobia showed great identity (87%) with that of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). The protein sequence of the fragment included two transmembrane regions and two histidine boxes which were composite characteristics of a microsomal fatty acid desaturase. The enzyme gene expression in different tissues of cobia was determined using real-time quantity PCR (RTQ-PCR) and their expressive orders were as follows: brain > liver > heart, intestine, spleen, kidney and gill > muscle and skin; while no expression was detected in adipose tissue. A conclusion is that cobia has delta 6 fatty acid desaturase, which is a key enzyme for the synthesis of HUFAs. The enzyme gene is maximally expressed in the brain of the fish suggesting that the HUFAs has an important role in central nervous system. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010,17(6): 1183–1191]

Key words: HUFAs; Delta 6 fatty acid desaturase; gene cloning; gene expression; real-time quantity PCR; cobia

Corresponding author: DING Zhaokun. E-mail: ZhaokunD@hotmail.com