

鲢鱼解偶联蛋白 2 全长 cDNA 序列的克隆及其组织表达

廖婉琴, 梁旭方*, 王琳, 马旭, 方玲, 李贵生

(暨南大学 生命科学技术学院, 广州 510632)

摘要: 从淡水食毒藻鱼类鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 肝脏, 通过简并引物克隆解偶联蛋白 2 (uncoupling protein 2, UCP2) cDNA 核心序列, 应用 5'RACE 和 3'RACE 技术分别扩增该序列的 5'末端和 3'末端序列, 最后通过序列拼接获得鲢鱼肝脏 UCP2 cDNA 全序列。序列分析结果表明, 鲢鱼肝脏 UCP2 cDNA 全长 1 452 bp, 其中 5'-UTR 长 337 bp, 3'-UTR 长 182 bp, 编码区 933 bp, 编码 310 个氨基酸, 推测的氨基酸序列包含线粒体内膜载体蛋白 3 个特征结构及解偶联蛋白 (UCPs) 的特征序列。对鲢鱼不同组织 UCP2 的表达调控研究发现, 鲢鱼组织 UCP2 基因在肠道、肝脏、肌肉、脂肪组织均大量表达, 而在脑组织表达量较低, 这与鲢鱼体内微囊藻毒素在这几个组织的分布完全一致, 表明 UCP2 的功能可能与抑制微囊藻毒素引发过量活性氧 (ROS) 生成有关。

关键词: 解偶联蛋白 2; cDNA; 基因表达; 活性氧; 鲢鱼

中图分类号: S965.113; Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254–5853 (2006) 04–0375–07

cDNA Sequence Cloning and Tissue Expression of Uncoupling Protein 2 of Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)

LIAO Wan-qin, LIANG Xu-fang*, WANG Lin, MA Xu, FANG Ling, LI Gui-sheng

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Shipai, Guangzhou 510632, China)

Abstract: PCR using two degenerated primers designed on the basis of the conserved region of mammals and fish uncoupling protein 2 (UCP2) gene yielded a cDNA fragment of 620 bp in the liver of silver carp. This cDNA fragment was completed by 5' and 3' RACE. The full-length silver carp UCP2 cDNA clone was 1 452 bp in length, containing an open reading frame of 933 bp (encoding 310 amino acids), flanked by 337 bp 5'UTR and 182 bp 3'UTR. The deduced amino acid sequence from this UCP2 cDNA fragment contains three signature motifs of mitochondrial transporter protein, and UCP-specific sequences. Tissue-expression analysis revealed that the silver carp UCP2 was highly expressed in intestine, liver, muscle and adipose tissue, but lower in brain tissue. This tissue expression pattern is consistent with the microcystins distribution among these tissues, suggesting that UCP2 expression level has a close relationship with the over-produced ROS which is induced by microcystins.

Key words: Uncoupling protein 2; cDNA; Gene expression; ROS; Silver carp

通过生理性解偶联调节氧化磷酸化效率, 兼顾 ATP 的有效合成与抑制呼吸链活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的过量生成, 可能是进化早期发展起来对生命存在至关重要的一种普遍策略, 其分子机理是目前国内外研究的热点 (Krauss et al, 2005; Andrews et al, 2005; Rousset et al, 2004;

Nedergaard et al, 2005)。解偶联蛋白 2 (uncoupling protein 2, UCP2) (Fleury et al, 1997; Gimeno et al, 1997) 在哺乳动物组织中广泛表达, 由于其序列与 UCP1 存在高度同源性, 有关其功能的早期假说仅着眼于产热作用, 但 Stuart et al (1999) 发现在变温动物鱼类中亦存在 UCP2, 因而认为 UCP2

* 收稿日期: 2006–02–27; 接受日期: 2006–06–10

基金项目: 广东省科技计划项目

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: tliangxf@jnu.edu.cn

第一作者简介: 廖婉琴 (1980–), 女, 硕士研究生, 主要从事基因克隆与表达调控研究。

的主要功能应与产热无关。Echtay et al (2002) 最新体外研究发现, 过氧化物促进 UCP2 基因表达, 而 UCP2 高表达有效抑制 ROS 过量产生, 但至今仍缺乏 UCP2 抑制 ROS 发生的活体实验依据。我们对具两种不同贮脂器官之海水鱼类真鲷的研究结果表明, 冷血动物真鲷 UCP2 基因在氧化活性高的肝脏大量表达, 且表达十分稳定, 而在氧化活性低的腹腔肠系膜脂肪组织则仅有痕迹量表达。真鲷肝脏和腹腔肠系膜脂肪组织 UCP2 基因表达水平的强烈反差, 与两种贮脂器官完全不同的氧化活性相一致, 但冷血动物 UCP2 的表达水平是否与 ROS 生成有关尚待研究确定 (Liang et al, 2003)。鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 是一种淡水食毒藻鱼类, 其食物中含有大量微囊藻毒素, 该毒素可引发小鼠肝脏过量 ROS 生成, 并造成小鼠肝组织损伤。鲢鱼 UCP2 基因 cDNA 全序列克隆与分子进化分析及其组织表达研究, 将为脊椎动物 UCP2 基因结构与功能研究提供新信息。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

鲢鱼 (全长 15—17 cm) 于广州珠江水产研究所养殖场捕得。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成 鲢鱼捕获后立即分离其肝脏、肠道、脂肪、肌肉和大脑组织。总 RNA 的提取与纯化按 Promega 公司的 SV Total RNA Isolation System 试剂盒推荐方法进行。cDNA 第一链的合成使用 TaKaRa RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver.1.1 试剂盒, 以鲢鱼肝脏总 RNA 为模板, oligo (dT)₁₈ 为反转录引物, 操作按试剂盒推荐方法进行。

1.2.2 鲢鱼 UCP2 基因 cDNA 核心片段的克隆 根据已知脊椎动物 UCP2 基因氨基酸序列的保守区域设计两条简并引物: UCP01F: 5' TTTCCACTGGA-CACCCGAAA (G)GT-3' 和 UCP02R: 5'-GTGACAAA-CATAACCACA (G)TTCCA-3'。PCR 扩增条件均为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 60 s, 40 °C 60 s, 72 °C 60 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳纯化, H. Q. & Q. Gel Extraction Kit II (U-gene) 回收后克隆至 pMD 18-T 载体 (TaKaRa), 转化感受态 *E. coli* JM109, 利用 M13 正反向引物, 通过 PCR 反应检测得到阳性克隆,

阳性克隆由博亚公司进行测序。用 DNA 分析软件 Vector NTI suite 6.0 进行序列分析。

1.2.3 鲢鱼 UCP2 基因 5' 端 cDNA 扩增 根据克隆得到的鲢鱼 UCP2 cDNA 核心片段设计 5' RACE 反转录引物 (RT): 5'-(P)TCAACCTACTGCCA-3' 和两对 PCR 引物——S1: 5'-ACTGCAGCGTCAGATGAG-3', A1: 5'-ACCGGACCATGGCCTGTGTT-3'; S2: 5'-TCTGTACGCATTGGCCTCTA-3', A2: 5'-TTGCGGTGTCCACTGGAA-3'。5' RACE 的操作按 5'-Full RACE Core Set 试剂盒 (TaKaRa) 推荐方法进行。

反转录产生 cDNA 模板: 取 5 μL 总 RNA (约 5 μg), 加 1.5 μL 10 × RT Buffer、0.5 μL RNase Inhibitor、1 μL RT 引物、1 μL AMV 反转录酶和 6 μL RNase Free H₂O, 于 45 °C 温育 10 min, 50 °C 反应 30 min, 80 °C 2 min 终止反应。

Hybrid RNA 的分解: 于上述 cDNA 反应液加入 5 × Hybrid RNA Degradation Buffer、45 μL ddH₂O、1 μL RNase H, 于 30 °C 反应 1 h 后加入 100 μL 的 ddH₂O 和 500 μL 冰冷的无水乙醇, 均匀混合后, -20 °C 放置 30 min。14 000 r/min 离心 10 min, 用 500 μL 的 70% 乙醇洗涤沉淀。

单链 cDNA 的环化: 于上述沉淀中加入 8 μL 5 × RNA (ssDNA) Ligation Buffer、12 μL ddH₂O、20 μL 40% PEG # 6000 和 1 μL T4 连接酶, 16 °C 反应过夜, 反应结束后用 TE Buffer 稀释 10 倍备用。

扩增: 第一次 PCR 反应体系为 4 μL 10 倍稀释产物、5 μL 10 × Ex Taq buffer、4 μL 2.5 mmol/L dNTP、Ex Taq 酶 0.25 μL, 以及 S1、A1 引物各 1 μL, 加水至 50 μL。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 随之 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 25 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。第二次 PCR: 取第一次扩增产物 1 μL, 用 S2、A2 引物按以上程序进行 PCR 反应, 但退火温度为 60 °C, 循环次数为 30 次。

1.2.4 鲢鱼 UCP2 基因 3' 端 cDNA 扩增 3' RACE 的操作参照 3'-Full RACE Core Set 试剂盒 (TaKaRa) 推荐方法进行。首先以试剂盒提供的 Oligo dT-3 sites Adaptor primer 为引物进行反转录反应。然后以试剂盒提供的 3 sites Adaptor primer 和 5' RACE 的 S1 为引物进行首次 PCR 反应, PCR 反应条件与 5' RACE 第一次 PCR 相同, 但循环次数为 30 次; 巢式 PCR 所用引物为 3 sites Adaptor primer 和 S2, PCR 反应条件与 5' RACE 二次 PCR 相同。

5'RACE 和 3'RACE 扩增得到的目的片段回收、纯化后克隆至 pMD 18-T 载体, 转化感受态 *E. coli* JM109, 应用 PCR 反应对阳性克隆进行鉴定, 最后由博亚公司对所获得的阳性克隆进行序列测定。

1.2.5 鲢鱼肝脏 UCP2 基因 cDNA 全序列的鉴定
为了验证通过序列拼接所得到的为鲢鱼肝脏 UCP2 cDNA 全序列, 分别从该序列的 5'末端和 3'末端设计上下游引物 scUCP201F (TGGAGCAGAGCAC-CTGCCGTT) 和 scUCP202R (GGCAGATTCTGAAA-GACAG), 以鲢鱼肝脏总 RNA 为模板进行 PCR 鉴定。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 90 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。

1.2.6 组织 mRNA 水平的测定 用半定量 PCR 方法比较鲢鱼肝脏、肠道、脂肪、肌肉和大脑 UCP2 的 mRNA 水平, 以 β -肌动蛋白为外参照。总 RNA 提取和 cDNA 合成同前所述, 用 UCP2 基因特异引物 UCP03F (5'-GGTCCGGTGAAATATCGTG-3') 与 UCP04R (5'-CAGGGAAGATCATCAGTCAT-3') 扩增一个 485 bp 的 UCP2 cDNA 片段。

用引物 ACT01F (5'-CGTGACATCAAGGA-GAAGC-3') 与 ACT02R (5'-TCTGCTGGAAGGTG-GACAG-3') 扩增一个 436 bp 的 β -肌动蛋白 cDNA 片段。

PCR 反应条件同上, 指数增长期内终止反应。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色后用凝胶成像系统及相关软件进行分析 (Alpha-mager™, Alpha innotech, USA), 结果以 UCP2 与 β -肌动蛋白 mRNA 的 RT-PCR 产物亮度之比 (%) 表示。

1.2.7 统计分析 应用统计分析软件 SPSS 10.0 对鲢鱼不同组织 UCP2 相对表达水平平均值差异进行统计分析。若 $P < 0.05$, 平均值的差异即认为是显著的。

2 结果与分析

2.1 鲢鱼 UCP2 cDNA 部分序列的扩增和克隆

根据已知脊椎动物 UCP2 的氨基酸保守区域设计简并引物 UCP01F 和 UCP02R, 以鲢鱼肝脏 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到预期片段大小的 PCR 产物。将 PCR 产物电泳纯化、回收后克隆至 pMD 18-T 载体。用 M13 正向引物进行单向测序, 结果得到一个 620 bp 的鲢鱼肝脏 UCP2 cDNA 核心片段,

通过 GenBank 检索, 它和圆鳍雅罗鱼 (*Leuciscus cephalus*) UCP2 有 96% 的同源性。

2.2 鲢鱼 UCP2 RACE 扩增和克隆

5'RACE 用基因特异引物 RT 引物进行反转录, 利用 S1/A1 和 S2/A2 进行巢式 PCR 扩增, 结果得到一约 500 bp 的特异片段, 与预期片段大小相符。3'RACE 用 3 sites Adaptor primer 和 S1/S2 进行半巢式 PCR 扩增, 电泳结果显示在约 800 bp 处有一特异条带, 与预期片段大小相吻合。RACE 扩增产物进行电泳纯化、回收后克隆至 pMD 18-T 载体。阳性克隆通过 PCR 鉴定后进行序列测定, 结果表明: 5'RACE 片段长 532 bp, 与核心序列重叠 82 bp; 3'RACE 片段长 833 bp, 与核心序列重叠 93 bp。

2.3 鲢鱼 UCP2 cDNA 全序列分析

通过序列拼接, 最终得到鲢鱼肝脏 UCP2 cDNA 全序列。以鲢鱼肝脏总 RNA 为模板, 通过 PCR 反应进一步确认该拼接序列为鲢鱼肝脏 UCP2 cDNA 全序列 (图 1)。序列分析结果表明, 该序列全长 1 452 bp, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为

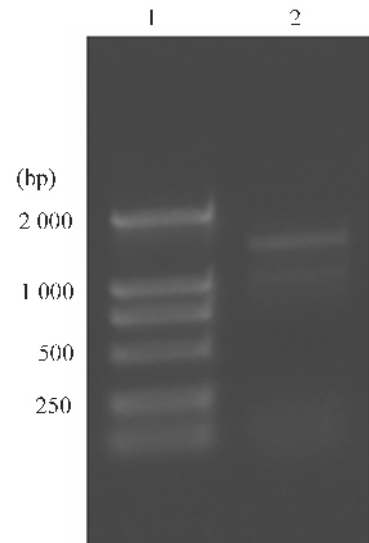


图 1 鲢鱼 UCP2 基因全长 cDNA 片段

Fig. 1 The full-length silver carp UCP2 cDNA

1: DNA marker; 2: 鲢鱼 UCP2 基因全长 cDNA 片段。

1: DNA marker; 2: PCR product of complete sequence of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) UCP2 cDNA.

TAA, polyA 加尾信号为 AATAAA。开放阅读框 (ORF) 长 933 bp, 编码 310 个氨基酸。5'端非翻译区 (5'-UTR) 长 337 bp, 3'端非翻译区 (3'-UTR) 长 182 bp。该序列推测的氨基酸序列具有 3 个线粒体内膜载体蛋白特征结构域、6 个跨膜 α -螺旋结

构域、嘌呤结合区域 (PNBD) 以及解偶联蛋白的特征序列 (图 2)。

2.4 UCP2 氨基酸序列的同源性分析

哺乳类完整的 UCP2 由 309 个氨基酸组成, 鲢鱼、鲤鱼、斑马鱼等鱼类 UCP2 则于相当于哺乳类 UCP2 54—55 位氨基酸残基间插入 1 个氨基酸, 均由 310 个氨基酸组成。与鲢鱼比较, 鲤鱼、斑马鱼、人、小鼠、大鼠、狗、猪 UCP2, 氨基酸序列的同源性分别为 96%、96%、82%、82%、81%、

83%、80% (图 3), 表明 UCP2 编码区在哺乳动物、鱼类中均具有较高保守性, 提示 UCP2 在脊椎动物中扮演着重要的生理角色。

2.5 鲢鱼不同组织 UCP2 基因的表达情况

以 β -肌动蛋白为外参照研究鲢鱼不同组织 UCP2 基因的表达水平, 结果发现, 鲢鱼 UCP2 基因在肝脏、肌肉、肠道、脂肪大量表达 (图 4), 而鲢鱼脑 UCP2 基因的表达水平则明显低于鲢鱼肝脏、肌肉、肠道、脂肪 UCP2 基因的表达水平 (表 1)。

```

1  TGGAGCAGAGCACTGCGTTTTTTAACTGTTGCTTCCGAGGAAATATTTTTCCAGTAAAATACTTTTATTCATAGACACTTTATA 91
92  CATTTTTGTCAAGACTTTGGAGTAGTTTCTTATTTGTACGGGTTCTAAACGTTTCTCTATGGAAGAACACGCCAACAAAAATCAAGTT 181
182  GAAAGTAATTTCAACCAGAGAGATACTTTTGAAGAAATCCTGAAGTTCTCGTCCCAACCGGTTAGGGTGGAGTTACCTATCTTTGTGTCA 271
272  CTTCAATGGTTTCAACACATTCGCGTTCAATTTTTACATCCCGTGATTCGCACTTCAATTAACAATGGTTGGATTGAGAGCTGGTGAT 361
1  M V G F R A G D 8

362  GTGCCTCTACGCCACTGTGAAGTTTATGGTGCGGAACTGCAGCCTGCATTGCAGACCTCTTCACATTTCCACTGGACACCCGAAAA 451
9  V P P T A T V K F I G A G T A A C I A D L E F T F P L D T A K 38

452  GTTAGACTTCAGATTCAAGGGGAGACAAAGGCTTCCGAACACAGGCCATGGTCCGGTGAATATCGTGGAGTGTGGTACGATCAGC 541
39  V R L Q I Q G E T K G L A N T G H G P V K Y R G V F G T I S 68

542  ACCATGGTGCGTGTGCGAGGGCCGCGCAGTCTCTACAGCGGGCTGGTTCGGGACTGCAGCGTCAGATGAGCTTTGCCTCTGTACGCATT 631
69  T M V R V E G P R S L Y S G L V A G L Q R Q M S F A S V R I 98

632  GGCCTCTACGATTACGTAACGCACTTCTACACAAAGGCTCAGATCAGGTTGGGATTGGCAGTAGGTTGATGGCCGGCTGTACGACTGGA 721
99  G L Y D S V K Q F Y T K G S D H V G I G S R L M A G C T T G 128

722  GCCATGGCAGTGCGCTCTGGCCCAACCCACAGATGTGGTGAAGGTACGGTTTCAGGCTCAGATCAGCGCTGGGGCCAAATAAACGTTACCAT 811
129  A M A V A L A Q P T D V V K V R F Q A Q I S A G A N K R Y H 158

812  GGCACAATGGATGCGTATCGGACCATTGCAAAAGGAAGGGGTTTCGTGGTTTGTGAAAGGAACTGGCCCAACATCACCCGCAATGCC 901
159  G T M D A Y R T I A K E E G F R G L W K G T G P N Y T R N A 188

902  ATTGTAACACTGCACTGAGCTGGTGACCTATGACCTCATCAAAGATGCACTTCTAAAATCCTCGTGATGACTGATGATCTTCCTGCCAC 991
189  I V N C T E L V T Y D L I K D A L L K S S L M T D D L P C H 218

992  TTCACATCGATTGGAGCTGGTTTCTGCCTACAGTATTGCTTCTCTGTTGATGTTGTGAAGACAAGATACATGAACTCCGCCCG 1081
219  F T S A F G A G F C T T V I A S P V D V V K T R Y M N S A Q 248

1082  GGCCAGTACAGCGGTGCCTTCAACTGTGCTGTAGCCATGCTAACTAAAGAGGGCCAAAGGCTTTTTACAAGGATTTCATGCCATCGTTC 1171
249  G Q Y S G A F N C A V A M L T K E G P K A F Y K G F M P S F 278

1172  CTGAGGCTGGGCTCTGGAATGTGGTTATGTTTGTACCTATGAACAGCTGAAACGGGCCATGATGGCAGCTCCGCATAACTGGGCTACT 1261
279  L R L G S W N V V M F V T Y E Q L K R A M M A A R H N W V T 308

VI
1262  CCTCTTTAAAGCAGAGAATGCAGTTAGTTGAGCTTTGCTGATGTGGTTCTAACCTTCTCTTTCTTTTATAGATTTTCTGTGTGAATTTGTTT 1351
309  P L *** 310

1352  ACATGTCTATTAACCTTGATCTTTGGTTTTTACATGGTTCTTTCTGTCTTTCAGAATCTGCCAATAAAAATTAGGATATTAACCTTGTAA 1441
1442  AAAAAAAAAA 1452

```

图 2 鲢鱼 UCP2 cDNA 核苷酸序列及推测氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide sequence of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) uncoupling protein 2 cDNA and predicted amino acid sequence

*: 终止密码子, 方框表示线粒体内膜载体蛋白特征结构域; I—VI: 6 个跨膜 α -螺旋结构域; 双下划线: 嘌呤结合区域 (PNBD); 阴影: 解偶联蛋白的特征序列; 黑体 (AATAAA): polyA 加尾信号。

Three asterisks represent a termination codon. The three mitochondrial carrier protein motifs are boxed. The six potential transmembrane α -helix domains are single-underlined and labeled by I - VI. The purine-nucleotide domain (PNBD) is double-underlined. The UCP-specific sequences are darkened. The boldfaced (AATAAA) is polyadenylation signal. The sense strand is displayed from the 5' to 3' direction.

```

sc 1  MVGFRAGDVPPTATVKFIGAGTAACIADLTFPLDTAKVRLQIQGETKGLANTGHGPVKY 60
cc 1  MVGFRAGDVPPTATVKFIGAGTAACIADLTFPLDTAKVRLQIQGESKIPVNTGHGPVKY 60
z 1  MVGFRAGDVPPTATVKFIGAGTAACIADLTFPLDTAKVRLQIQGENKASTNMGGRGPVKY 60
h 1  MVGFKATDVPPTATVKFLGAGTAACIADLITFPLDTAKVRLQIQGESQGPVRAT-ASAQY 59
m 1  MVGFKATDVPPTATVKFLGAGTAACIADLITFPLDTAKVRLQIQGESQGLVRTA-ASAQY 59
r 1  MVGFKATDVPPTATVKFLGAGTAACIADLITFPLDTAKVRLQIQGESQGLARTA-ASAQY 59
d 1  MVGFKATDVPPTATVKFLGAGTAACIADLITFPLDTAKVRLQIQGERQGPVRAA-ASAQY 59
p 1  MVGFKATEVPPATVKFLGAGTAACIADLITFPLDTAKVRLQIQGERGPVQAA-ASAQY 59
      **** * ***** ***** ***** ***** *
sc 61  RGVFGTISTMVRVEGPRSLYSLVAGLQRQMSFASVRIGLYDSVKQFYTKGSDHVGIGSR 120
cc 61  RGVFGTISTMVRVEGPRSLYSLVAGLQRQMSFASVRIGLYDSVKQFYTKGSEHVGIGSR 120
z 61  RGVFGTISTMVRVEGPRSLYSLVAGLQRQMSFASVRIGLYDSVKQFYTKGSDHAGIGSR 120
h 60  RGVMTGILTMRTEGPRSLYNGLVAGLQRQMSFASVRIGLYDSVKQFYTKGSEHAGIGSR 119
m 60  RGVLTGILTMRTEGPRSLYNGLVAGLQRQMSFASVRIGLYDSVKQFYTKGSEHAGIGSR 119
r 60  RGVLTGILTMRTEGPRSLYNGLVAGLQRQMSFASVRIGLYDSVKQFYTKGSEHAGIGSR 119
d 60  RGVLTGILTMRTEGPRSLYNGLVAGLQRQMSFASVRIGLYDSVKQFYTKGSEHAGIGSR 119
p 60  RGVLTGILTMRNEGPRSLYNGLVAGLQRQMSFASVRIGLYDSVKHFYTKGSEHAGIGSR 119
      ** ** **** ***** ***** ***** ***** *
sc 121 LMAGCTTGAMAVALAQPTDVVKVRFQAQISAGANKRYHGTMDAYRTIAKEEGFRGLWKGT 180
cc 121 LMAGCTTGAMAVALAQPTDVVKVRFQAQNSAGANKRYHGTMDAYRTIAKEEGFRGLWKGT 180
z 121 LMAGCTTGAMAVAVAQPTDVVKVRFQAQVSAGSSKRYHSTMDAYRTIAKEEGFRGLWKGT 180
h 120 LLAGSTTGALAVAVAQPTDVVKVRFQAQARAGGRRYQSTVNEYKTIAREEGFRGLWKGT 179
m 120 LLAGSTTGALAVAVAQPTDVVKVRFQAQARAGGRRYQSTVEAYKTIAREEGIRGLWKGT 179
r 120 LLAGSTTGALAVAVAQPTDVVKVRFQAQARAGGRRYQSTVEAYKTIAREEGIRGLWKGT 179
d 120 LLAGSTTGALAVAVAQPTDVVKVRFQAQARAGGRRYQSTVDAYKTIAREEGFRGLWKGT 179
p 120 LLAGSTTGALAVAVAQPTDVVKVRFQAQARAGGRRYRSTVDAYKTIAREEGLRGLWKGT 179
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
sc 181 GPNITRNAIVNCTELVTYDLIKDALLKSSLMTDDLPCHFSAFGAGFCTTVIASPVDVVK 240
cc 181 GPNITRNAIVNCTELVTYDLIKDALLKSSLMTDDLPCHFSAFGAGFCTTVIASPVDVVK 240
z 181 GPNITRNAIVNCTELVTYDLIKDALLKSSLMTDDLPCHFSAFGAGFCTTVIASPVDVVK 240
h 180 SPNVARNAIVNCAELVTYDLIKDALLKANLMTDDLPCHFSAFGAGFCTTVIASPVDVVK 239
m 180 SPNVARNAIVNCAELVTYDLIKDTLLKANLMTDDLPCHFSAFGAGFCTTVIASPVDVVK 239
r 180 SPNVARNAIVNCTELVTYDLIKDTLLKANLMTDDLPCHFSAFGAGFCTTVIASPVDVVK 239
d 180 SPNVARNAIVNCAELVTYDLIKDALLKANLMTDDLPCHFSAFGAGFCTTVIASPVDVVK 239
p 180 SPNVARNAIVNCAELVTYDLIKDTLLKADLMTDDLPCHFSAFGAGFCTTVIASPVDVVK 239
      ** ***** ***** * * ***** *****
sc 241 TRYMNSAQGGYSGAFNCAVAMLTKEGPKAFYKGFMPFSLRLGSWNVVMFVTYEQLKRMM 300
cc 241 TRYMNSAPGQYCSALNCAVAMLTKEGPKAFYKGFMPFSLRLGSWNVVMFVTYEQLKRMM 300
z 241 TRYMNSAQGGYSSALNCAVAMLTKEGPKAFYKGFMPFSLRLGSWNVVMFVTYEQLKRMM 300
h 240 TRYMNSALGQYSSAGHCALTMLKQEGPRAFYKGFMPFSLRLGSWNVVMFVTYEQLKRMM 299
m 240 TRYMNSALGQYHSAGHCALTMLRKEGPRAFYKGFMPFSLRLGSWNVVMFVTYEQLKRMM 299
r 240 TRYMNSALGQYHSAGHCALTMLRKEGPRAFYKGFMPFSLRLGSWNVVMFVTYEQLKRMM 299
d 240 TRYMNSALGQYSSAGHCALTMLKQEGPRAFYKGFMPFSLRLGSWNVVMFVTYEQLKRMM 299
p 240 TRYMNSAPGQYSSAGHCALTMLKQEGPRAFYKGFPTFSLRLGSWNVVMFVTYEQLKRMM 299
      ***** ** * * ***** ***** ***** ***** *
sc 301 AARHNWVTP 310
cc 301 AARHNWATPL 310
z 301 AARQNWHTPL 310
h 300 AACTSREAPF 309
m 300 AACQSREAPF 309
r 300 AAYESREAPF 309
d 300 AACTSREAPF 309
p 300 AARASREAPF 309
      ** *

```

图 3 鲢鱼与其他脊椎动物 UCP2 基因氨基酸序列同源性比较

Fig. 3 Alignment of the deduced amino acid sequences of the UCP2 from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) with the sequences of other vertebrates

* : 保守的氨基酸残基; sc: 鲢鱼; cc: 鲤鱼; z: 斑马鱼; h: 人; m: 小鼠; r: 大鼠; d: 狗; p: 猪。

The identity residues are indicated by * . sc: silver carp; cc: common carp; z: zebrafish; h: human; m: mouse; r: rat; d: dog; p: pig.

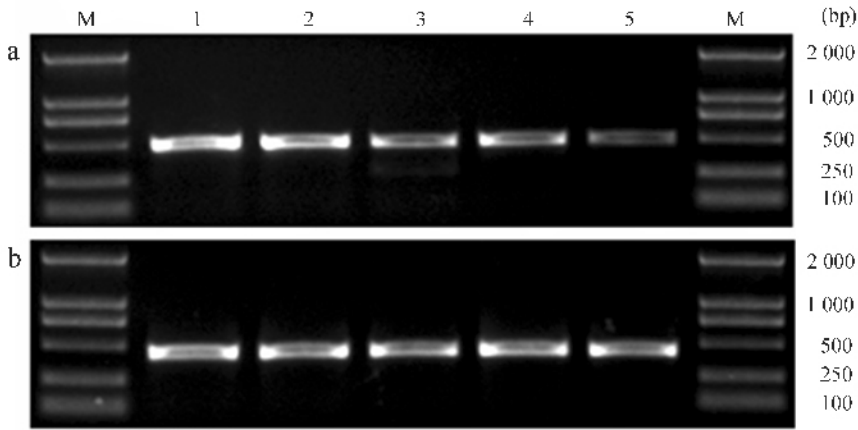


图 4 鲢鱼不同组织 UCP2 (a) 和 β -肌动蛋白 (b) mRNA 表达的 RT-PCR 分析
Fig. 4 Analysis of UCP2 (a) and β -actin (b) mRNA expression in different tissue of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by RT-PCR

M: marker; 1: 肝脏; 2: 肠道; 3: 脂肪; 4: 肌肉; 5: 脑。

M: marker; 1: liver; 2: intestine; 3: adipose tissue; 4: muscle; 5: brain.

表 1 鲢鱼不同组织 UCP2 基因的表达比较

Tab. 1 UCP2 gene expression in different tissue of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)

组织 Tissue	Ratio UCP2/beta-actin mRNA (%)
肝脏 Liver	96.05 \pm 10 ^a
肠道 Intestine	97.85 \pm 1.5 ^a
脂肪 Adipose	83.45 \pm 2.6 ^a
肌肉 Muscle	85.35 \pm 1.2 ^a
脑 Brain	61 \pm 0.4 ^b

3 讨论

我们克隆的鲢鱼 UCP2 cDNA 全序列长为 1 452 bp, 编码 310 个氨基酸, 包含线粒体内膜载体蛋白三个特征结构: 特征结构 PLDTAKVRL 位于鲢鱼 UCP2 第 33 位到第 41 位氨基酸; 特征结构 PT-DVVKVRF 位于鲢鱼 UCP2 第 137 到 145 位氨基酸; 特征结构 PVDVKTRY 位于鲢鱼 UCP2 第 235 位到 243 位氨基酸 (Fig. 2) (Bouillaud et al, 1994; Palmieri & Bouillaud, 2000)。人类 UCP1 第 146 位和第 148 位氨基酸均为组氨酸, 这两个组氨酸被认为是对于 UCP1 解偶联功能所必需的 (Klingenberg, 1990), 而脊椎动物 UCP2 在这两个相应位置则均不是组氨酸, 这一点被认为是脊椎动物 UCP2 区别于 UCP1 的最重要结构特征。我们克隆的鲢鱼 UCP2 在这两个相应位置上也不是组氨酸而分别是丝氨酸和甘氨酸。此外, 存在于第 1、2、4 跨膜 α -螺旋结构域中及第 3 与第 4 跨膜 α -螺旋结构域间解偶联蛋白 (UCPs) 的特征序列 (Ježek & Urbánková, 2000; Hanák & Ježek, 2001), 亦均存

在于鲢鱼 UCP2 氨基酸序列中。

序列同源性比较发现同科真骨鱼类 UCP2 氨基酸序列有很高的同源性, 鲢鱼与鲤鱼、斑马鱼 (同属鲤科) UCP2 氨基酸序列同源性则高达 96%; 而鲢鱼、鲤鱼、斑马鱼等鱼类与哺乳类 UCP2 氨基酸序列也有较高的同源性, 为 80%—83%。由此表明 UCP2 编码区在哺乳动物、鱼类中均具有较高保守性, 提示着 UCP2 可能在线粒体有氧呼吸代谢过程中承担某种最基本的生命功能。

UCP2 具体的生理功能虽然目前尚无定论, 但相关研究表明, UCP2 可以抑制某些细胞 (如免疫细胞等) 线粒体 ROS 的过量生成 (Fleury et al, 1997; Collins et al, 2005)。人类 UCP2 在脾脏、胸腺、白细胞等免疫系统中的高水平表达, 提示着 UCP2 在免疫方面起着重要作用 (Fleury et al, 1997)。UCP2 的这一功能进一步为 Larrouy et al (1997) 的工作所证实, 他们发现 UCP2 在 Kupffer 细胞中亦大量表达。ROS 在杀灭病原生物的免疫细胞毒方面起着关键作用。但我们的前期工作表明, 过量的 ROS 对机体自身组织也可引起不同程度的损伤 (Hwang & Liang, 1989, 1991; Chen et al, 1992)。因此, UCP2 在免疫系统中的大量表达, 可能是机体抑制免疫过程中过量产生 ROS 的一种保护适应机制。我们对具两种不同贮脂器官之海水鱼类真鲷 UCP2 基因的组织表达研究发现, 真鲷 UCP2 基因在肝脏稳定大量表达, 而在腹腔肠系膜则仅有痕迹量表达, 真鲷肝脏和腹腔肠系膜脂肪

组织 UCP2 基因表达水平的强烈反差, 与这种鱼类这两种贮脂器官完全不同的氧化活性相一致, 但 UCP2 的表达水平是否与 ROS 生成有关尚待研究确定。

大量研究表明, 由淡水蓝藻产生的微囊藻毒素对动物和人类具有明显的毒性作用, 其致毒机理涉及大量 ROS 生成 (Codd, 1995; Dawson, 1998; Carmichael, 2001; Falconer, 2001; Lankoff et al, 2004)。鲢鱼是一种分布于亚洲东部淡水水域的专性食藻鱼类, 由于其食物中常含有大量微囊藻毒素, 因而鲢鱼已进化出有效的微囊藻毒素去毒能力, 其中最引人关注的是鲢鱼微囊藻毒素聚积器官的抗 ROS 机制。Xie et al (2004) 通过慢性供给毒

素实验证实, 微囊藻毒素在鲢鱼体内的吸收途径与食物来源脂类物质的吸收途径类似: 微囊藻毒素从食道进入并经胃肠道消化吸收后, 通过血液循环运输至肝脏、肌肉、肠道等器官, 但由于血脑屏障的保护, 毒素不易进入大脑。与此相对应, 我们研究发现, 鲢鱼 UCP2 基因在肝脏、肌肉、肠道、肠系膜脂肪组织均大量表达, 这与微囊藻毒素进来后可在这些组织引发产生过量的 ROS 相适应, 而脑中微囊藻毒素可引发产生 ROS 较少, 因而鲢鱼 UCP2 基因在脑组织的表达量相应较低。由此我们认为, 鲢鱼组织 UCP2 基因表达与体内微囊藻毒素分布完全一致, UCP2 的功能可能与抑制微囊藻毒素引发的 ROS 过量生成有关。

参考文献:

- Andrews ZB, Diano S, Horvath TL. 2005. Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: In support of function and survival [J]. *Nat Rev Neurosci*, **6** (11): 829–840.
- Bouillaud F, Arechaga I, Petit PX, Raimbault S, Levi-Meyrueis C, Casteilla L, Laurent M, Rial E, Ricquier D. 1994. A sequence related to a DNA recognition element is essential for the mitochondrial uncoupling protein [J]. *EMBO J*, **13** (8): 1990–1997.
- Carmichael WW. 2001. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: the CyanoHABs [J]. *Hum Ecol Risk Assess*, **7**: 1393–1407.
- Chen JW, Zhang L, Liang XF, Hwang F. 1992. Effect of hydroxyl radical on Na-K-ATPase activity of the brain microsomal membranes [J]. *Cell Biol Int Rep*, **16** (9): 927–936.
- Codd GA. 1995. Cyanobacterial toxins: Occurrence, properties and biological significance [J]. *Wat Sci Technol*, **32** (1): 149–156.
- Collins P, Jones C, Choudhury S, Damelin L, Hodgson H. 2005. Increased expression of uncoupling protein 2 in HepG2 cells attenuates oxidative damage and apoptosis [J]. *Liver Int*, **25** (4): 880–887.
- Dawson RM. 1998. The toxicology of microcystins [J]. *Toxicol*, **36** (7): 953–962.
- Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD. 2002. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins [J]. *Nature*, **415** (6867): 96–99.
- Falconer IR. 2001. Toxic cyanobacterial bloom problems in Australian waters: Risks and impacts on human health [J]. *Phycologia*, **40**: 228–233.
- Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. 1997. Uncoupling protein 2: A novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia [J]. *Nat Genet*, **15** (3): 269–272.
- Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA. 1997. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: A potential mediator of human thermogenesis [J]. *Diabetes*, **46** (5): 900–906.
- Hanák P, Ježek P. 2001. Mitochondrial uncoupling protein and phylogenesis: UCP4 as the ancestral uncoupling protein [J]. *FEBS Lett*, **495** (3): 137–141.
- Hwang F, Liang XF. 1989. Spin-trapping studies of free radicals in human erythrocytes [J]. *Stud Biophys*, **134** (1): 105–110.
- Hwang F, Liang XF. 1991. Damage to membrane lipids and proteins of brain microsomes by hydroxyl radicals [J]. *Acta Biophys Sin*, **7** (1): 223–226. [黄芬, 梁旭方. 1991. 羟基自由基对兔脑微粒体膜脂及膜蛋白的损伤. *生物物理学报*, **7** (1): 223–226.]
- Ježek P, Urbánková E. 2000. Specific sequence motifs of mitochondrial uncoupling proteins [J]. *IUBMB Life*, **49** (1): 63–70.
- Klingenberg M. 1990. Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue [J]. *Trends Biochem Sci*, **15** (3): 108–112.
- Krauss S, Zhang CY, Lowell BB. 2005. The mitochondrial uncoupling-protein homologues [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6** (3): 248–261.
- Lankoff A, Krzowski L, Glab J, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gozdz S, Wojcik A. 2004. DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR [J]. *Mutat Res*, **559** (1–2): 131–142.
- Larrouy D, Laharrague P, Carrera G, Viguerie-Bascands N, Levi-Meyrueis C, Fleury C, Pecqueur C, Nibbelink M, Andre M, Casteilla L, Ricquier D. 1997. Kupffer cells are a dominant site of uncoupling protein 2 expression in rat liver [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **235** (3): 760–764.
- Liang XF, Ogata HY, Oku H, Chen JW, Hwang F. 2003. Abundant and constant expression of uncoupling protein 2 in the liver of red sea bream *Pagrus major* [J]. *Comp Biochem Physiol A*, **136** (3): 655–661.
- Nedergaard J, Ricquier D, Kozak LP. 2005. Uncoupling proteins: Current status and therapeutic prospects [J]. *EMBO rep*, **6** (10): 917–921.
- Palmieri D, Bouillaud F. 2000. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP [J]. *Biochem J*, **345** Pt 2: 161–179.
- Roussel S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D. 2004. The biology of mitochondrial uncoupling proteins [J]. *Diabetes*, **53** (suppl. 1): S130–S135.
- Stuart JA, Harper JA, Brindle KM, Brand MD. 1999. Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates [J]. *Biochem Biophys Acta*, **1413** (1): 50–54.
- Xie L, Xie P, Ozawa K, Honma T, Yokoyama A, Park HD. 2004. Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment [J]. *Environ Pollut*, **127** (3): 431–439.