

鲈鱼酰基辅酶 A 结合蛋白 *Acbp* 基因 cDNA 的克隆和诱导表达

钱云霞* 杨孙孝 童丽娟 宋娟娟 钱 伦

(宁波大学生命科学与生物工程学院, 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波 315211)

摘要 酰基辅酶A结合蛋白(acyl-CoA-binding protein, ACBP)对长链脂酰基辅酶A(long-chain fatty acyl-CoA esters, LCACoA)有很高的亲和力, 因而对LCACoA在细胞内的运输和利用过程起重要的作用。本文采用 RACE 技术从鲈鱼肝脏中克隆了 *Acbp* 基因的全长 cDNA 序列, 该基因全长 cDNA 679 bp, 5' 端和 3' 端的非翻译区分别为 83 bp 和 326 bp, 开放阅读框为 270 bp。推测编码 89 个氨基酸, 理论等电点为 5.44, 分子量为 10.14 kDa。鲈鱼 *Acbp* 与青鳉鱼、银鳕鱼、大西洋鲑和人的同源性分别为 87%、84%、78% 和 68%。用 RT-PCR 和实时定量 PCR 检测鲈鱼肌肉、心脏、眼、大脑、消化道、肾脏、脂肪组织、脾脏、鳃和肝脏等 10 种组织的 *Acbp* 基因的表达情况, 结果表明, 在肾脏和肝脏的表达量高, 肌肉、眼睛和大脑中表达低。定量 PCR 检测表明鲈鱼肝脏 *Acbp* 的表达在饥饿时明显下降, 胰岛素上调其表达, 葡萄糖对其表达则没有影响。

关键词 酰基辅酶 A 结合蛋白; 鲈鱼; 克隆; 表达

长链脂酰基辅酶 A(long-chain fatty acyl-CoA esters, LCACoA)是脂肪代谢的中间产物, 最近的研究发现 LCACoA 参与调节细胞的多种功能, 除了作为能源物质外, LCACoA 还是细胞膜的重要成分, 细胞的主要信号分子, 在免疫系统也有重要作用^[1,2]。酰基辅酶 A 结合蛋白(acyl-CoA-binding protein, ACBP)对酰基辅酶 A 尤其是 LCACoA 有很高的亲和力, 分子量约为 10 kDa。目前认为 ACBP 是细胞内 LCACoA 最主要的结合蛋白, 它能有效保护 LCACoA 不被硫酸酯酶水解, 既是 LCACoA 的受体, 也是它的供体, 同时 ACBP 又是 LCACoA 的转运子, 它能将 LCACoA 运输至线粒体进行 β -氧化, 运送到微粒体进行糖脂合成和磷脂的合成^[2-4]。在哺乳动物中, ACBP 的表达和脂肪合成有关, 肝脏 ACBP 在脂肪细胞分化过程中明显上调, 而饥饿会降低其表达, 这种调节可能跟胰岛素的作用有关^[4]。*Acbp* 基因 cDNA 序列已在哺乳动物、鸟类、两栖类、鱼类、昆虫、甲壳动物和酵母以及各种植物中被克隆^[1,2,5-7], 但鱼类报道的不多, 在 GenBank 和 EMBL 中仅见银鳕鱼(*Anoplopoma fimbria*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、青鳉鱼(*Oryzias latipes*)和鲤鱼(*Cyprinus carpio*)等近 10 种^[7]。

鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*), 也称海鲈、花鲈、七星鲈, 是一种广温性和广盐性的肉食性鱼类, 也是

我国重要的海水经济鱼类。对肉食性鱼类来说, 脂肪是其主要的能量来源之一, 同时还提供鱼体生长发育所需要的必需脂肪酸, 但是过多的脂肪又会造成脂肪在鱼体内大量沉积, 不仅会降低饲料转化率, 还可引发营养性脂肪肝。鉴于 ACBP 在脂类代谢中的重要作用, 本研究从鲈鱼肝脏中克隆了 *Acbp* 基因的 cDNA 全长序列并对其进行同源性比较和分析, 同时探讨了该基因在不同组织的表达分布以及饥饿、胰岛素和葡萄糖对肝脏 *Acbp* 的表达影响, 以期为进一步研究该基因的功能积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

克隆基因所用鲈鱼购自象山黄皮鲈养殖场, 鲈鱼平均体重 329±9.8 g。Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品。逆转录试剂 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、实时定量 PCR 试剂 SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit、DNase I (RNase free)、dNTP、Taq DNA 聚合酶、DNA 凝胶回收试剂盒、pMD18-T 载体等为 TaKaRa 公司产品(大连)。SMART™ RACE cDNA

收稿日期: 2010-05-18 接受日期: 2010-08-16

国家自然科学基金(No.30671608)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0574-87600169, E-mail: qianyunxia@nbu.edu.cn

Amplification Kit 为 Clontech 公司的产品。大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。引物由上海英骏生物工程公司合成。

1.2 *Acbp* 基因 cDNA 序列的克隆

解剖鲈鱼取出肝脏, 立即放入液氮, 随后置入 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。鲈鱼肝脏总 RNA 提取按厂家说明书进行。按照 TaKaRa 公司的 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书将肝脏总 RNA 逆转录成 cDNA, 并以此作为克隆 *ACBP* 核心片段的 PCR 模板。据已报道的 *ACBP* 保守序列设计简并引物 *ACBP*-F1 和 *ACBP*-R1, 克隆鲈鱼的核心片段, *ACBP*-F1 和 *ACBP*-R1 序列分别为 5'-AG(T) A(C)G (T)GA GGT G(C)A AGC AGC TGA A-3' 和 5'-CTT TCT G (C)G (C)CT TCT CCC AGG C-3'。PCR 反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共 33 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

5' RACE 和 3' RACE 扩增按照 Clontech 公司的 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行。先分别取 1 μ g 肝脏总 RNA 合成 3' 和 5' Ready cDNA。根据获得的核心片段序列, 设计鲈鱼 *Acbp* 的特异性 3' RACE 引物 *ACBP*-F2 和 5' RACE 引物 *ACBP*-R2, 序列分别为: 5'-TCA AGC AGG CGT CCG TGG GTG ATG TC-3' 和 5'-GTG AAA TCA AAC ATC CCT GGA CGA CC-3', 分别与试剂盒的通用引物 UPM 进行 3' RACE 和 5' RACE PCR 反应, 反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 25 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 将目标条带进行纯化、回收, 与 pMD18-T 载体连接, 转化感受态 DH5 α 。挑取阳性菌落进行 PCR 检测, 序列测定由上海英骏生物工程公司完成。

1.3 组织表达的 RT-PCR 和实时定量 PCR 分析

用 RT-PCR 和实时定量 PCR 检测鲈鱼肌肉、心脏、眼、大脑、消化道、肾脏、脂肪、脾脏、鳃和肝脏等 10 种组织中 *Acbp* 基因的表达情况。按前述方法提取鲈鱼各组织总 RNA, 用 DNase I (RNase free) 处理后, 逆转录为 cDNA。按已测序的鲈鱼 *Acbp* 的 cDNA 序列设计 RT-PCR 引物 *ACBP*-rtF(5'-GCT GAA GGC AAA GCC CAC A-3') 和 *ACBP*-rtR(5'-AGC CAT ACT TCT GCT TCA ACT C-3')。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 然后 95 $^{\circ}$ C 50 s, 54 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 2 min, 产物长度 215 bp。18S 参照

基因引物为 18S-F1 和 18S-R1, 序列分别为: 5'-GGC AGC GTC CGG GAA ACC AAA TTC-3' 和 5'-CCACCC ACA GAA TCG AGA AAG AGC-3', PCR 产物 196 bp。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 50 s, 54 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 26 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。RT-PCR 电泳产物各取 5 μ l 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用 Gel-Pro 软件进行分析, 计算 *Acbp* 与 18S 的光密度比值。

实时定量 PCR 采用 SYBR PrimeScriptTM RT-PCR Kit 在 Rotor-Gene 6000 实时定量 PCR 仪上进行, 以 β -Actin 作为内参基因校正实验误差。具体方法为: 先以 cDNA 为模板, 用引物 *ACBP*-rtF、*ACBP*-rtR 和 β -ActinF1 和 β -Actin R1(5'-ATC GCC GCA CTG GTT GTT G-3', 5'-GTT GTA GAA GGT GTG ATG CCA G-3', GenBank EU860101) 分别进行 PCR, 将 PCR 产物克隆至 pMD18-T 载体, 测序鉴定后作为标准品质粒。根据测得的标准品质粒的质量浓度 C_0 (g/ μ l) 换算成拷贝浓度 C (copy/ μ l), 换算公式: $C=(C_0 \times 6.02 \times 10^{23}) / MW$ 。将母液浓度调整成 1×10^{10} copy/ μ l 作原液, 取部分原液作 10 倍系列稀释成 10^9 (10^8)~ 10^4 copy/ μ l 梯度浓度标准品制备标准曲线。鲈鱼 *Acbp* 实时定量 PCR 引物为 Real-f-*ACBP*: 5'-CAA AGC CCA CAG ATG AAG AGA TG-3', Real-r-*ACBP*: 5'-TTG CTC TTG CCT TTC TGC TTC-3', 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 10 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环, 扩增产物 208 bp。 β -Actin 实时定量 PCR 引物为 Real-f-actin (5'-TGT GCA AAG CCG GAT TCG-3') 和 Real-r-actin (5'-CCT CTC TTG CTC TGG GCT TCA-3')。扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 10 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环, 扩增产物为 142 bp。实时定量 PCR 结束后对扩增产物进行熔解曲线分析, 以确保特异性扩增。根据标准曲线计算样品中 *Acbp* 基因 mRNA 的拷贝数。设定 *Acbp* 在肝脏中的表达量为 1, 根据 *Acbp* 在各组织中的表达相对量作图。以未加模板的 PCR 反应样品作为阴性对照, 共测定 3 条鱼。实验结果用 SSPS14 软件进行分析。

1.4 实时定量 PCR 分析鲈鱼 *Acbp* 基因的诱导表达

鲈鱼平均体重 60 ± 4.5 g, 平均体长 16.5 ± 1 cm, 饥饿实验在宁海黄避岙海水养殖网箱中进行, 水温 15 ± 3 $^{\circ}$ C, pH 7.2, 盐度为 25‰, 取 30 条鲈鱼放入一养殖网箱, 分别在投饵摄食后 5 h、24 h 和 192 h 随机各取 4 条鲈鱼, 用 MS222 麻醉后取肝脏。其余实验在室内圆桶中进行, 实验期间不投饵, 每桶的海水体积为 100 L, 放入 6 条鲈鱼, 设一空白对照组和阴性对照组(无菌生理盐水 0.85%, PS), 实验各组分别在

腹腔内注射葡萄糖(2 g/kg), 胰岛素(10 U/kg), 5 h 后每组随机取 4 条鲈鱼, MS222 麻醉取肝脏。实时定量 PCR 测定 *Acbp* 表达, 方法同 1.3。

2 结果

2.1 鲈鱼 *Acbp* 全长 cDNA 的克隆与分析

用鲈鱼肝脏 cDNA 作为模板, 引物 ACBP-F1 和 ACBP-R1 进行 PCR 扩增, PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后纯化并克隆测序, 得到扩增片段长度为 161 bp, 经过 Blast 分析确定为 *Acbp* 基因。据此片段序列设计特异性引物 ACBP-F2 和 ACBP-R2 进行 3'RACE 和 5'RACE PCR, 分别克隆得到 493 bp 的 3'RACE 产物和 243 bp 的 5'RACE 产物。将重叠的 3'、5' 末端序列拼接最终得到 *Acbp* 基因的全长 cDNA 序列 679 bp, 5' 端的非翻译区为 83 bp, 3' 端的非翻译区为 326 bp, 含有 PolyA 加尾信号 aataa, 最后以 poly(A) 结尾。整个 CDS 为 270 bp, 可以翻译成含有 89 个氨基酸残基的蛋白质, 其理论等电点为 5.44, 分子量为 10.14 kDa (图 1)。序列已经登录 GenBank, 登录号为 FJ858258.1。

2.2 鲈鱼 ACBP 的同源性分析和系统进化树构建

将鲈鱼 ACBP 氨基酸和其他鱼类的 ACBP 氨基酸序列进行同源性比较发现, 鲈鱼和青鳉鱼同源性最高, 达 87%, 其次是和银鳕鱼, 为 84%, 和大西洋鲑、虹

鳟、鲤鱼的同源性分别为 78%, 76% 和 72%。在哺乳动物中, ACBP 有三种亚型, 即肝型(Liver type, L 型)、脑型(Brain type, B 型)和精巢型(Testise type, T 型)。利用 MEGA4.0 软件构建 11 种动物的 19 个 ACBP 的进化树(图 3), 结果表明, 19 个 ACBP 按照这 3 个不同的类型聚合成 3 簇, 所有的 L-ACBP 成簇后与 B-ACBP 聚合, 再与 T-ACBP 聚合。鲈鱼 ACBP 先和其他鱼的 L-ACBP 聚合, 再与两栖动物和哺乳动物 L-ACBP 聚合, 聚合方式符合传统分类方法。

2.3 鲈鱼 *Acbp* 基因的组织表达分析

RT-PCR 以 18S RNA 作为内参照, 结果见图 4A。实时定量 PCR 以 β -Actin 为参照, 设定 *Acbp* 在肝脏中的表达量为 1, 根据 *Acbp* 在各组织中的相对表达量作图(图 4B)。结果表明, 鲈鱼 *Acbp* 在上述 10 种组织中都有表达, 其中在肾脏和肝脏的表达量较高, 其次是鳃、心、肠、脂肪和脾脏, 而在肌肉、眼睛和大脑中表达量较少。

2.4 鲈鱼 *Acbp* 基因的诱导表达

饥饿对鲈鱼肝脏 *Acbp* 的诱导表达结果见图 5A。饥饿(投饵摄食后)24 h 后鲈鱼肝脏 *Acbp* 的表达明显低于饥饿 5 h 组, 但饥饿时间 192 h 组(即 8 d)和 24 h 组没有差异。在注射胰岛素 5 h 后鲈鱼肝脏 *Acbp* 的表达比对照组有明显增加, 但是注射葡萄糖组和注射生理盐水组则没有变化, 见图 5B。

```

acagtagacttcacccccctaccatctatcgagacgtctgtctacaggctggccagcttgctttgtcgga 70
cccgtactaaagatggctgatctccaggctaaatttgatacagcagctgaggtgaagcagctgaag 140
      M A D L Q A K F D T A A A E V K Q L K
gcaaagccacagatgaagagatggtgcagggtctactccctgttcaagcaggcgtccgtgggtgatgtca 210
      A K P T D E E M L Q V Y S L F K Q A S V G D V
acacaggctcgtccagggtatgtttgatttcactgggaaagttaaatgggatgcctgggagaagcagaaagg 280
N T G R P G M F D F T G K V K W D A W E K Q K G
caagagcaaagaggatgccatgaacgagtacatcaacctgggtgaggagttgaagcagaagtatggcttc 350
      K S K E D A M N E Y I N L V E E L K Q K Y G F
taatgtcatgcgataacccctaagtggccagcttctggatggactgagagcactagctgagaccaccacc 420
      *
agttgccactcaccctgacactgagaaatgccttaaaacccaaggagtgtgtccttagacaacacatgtg 490
aatgcctgggtggaccactagtgggtcccaatgagattaagctggcctgaataaccactgatgcaagatcag 560
aaagtttgctccaccagagccccatcataatttagtcaagtgtttttaaccatgtgtatgtgcacagagtc 630
ttgtcatttcaatataaaatcattctctcttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 679

```

图 1 鲈鱼 ACBP 的核苷酸序列和氨基酸序列

下划线部分为 polyA 加尾信号, 星号表示终止密码子。

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of Sea Perch ACBP

The suggested polyA signal AATAA is underline, stop code is indicated by a star.

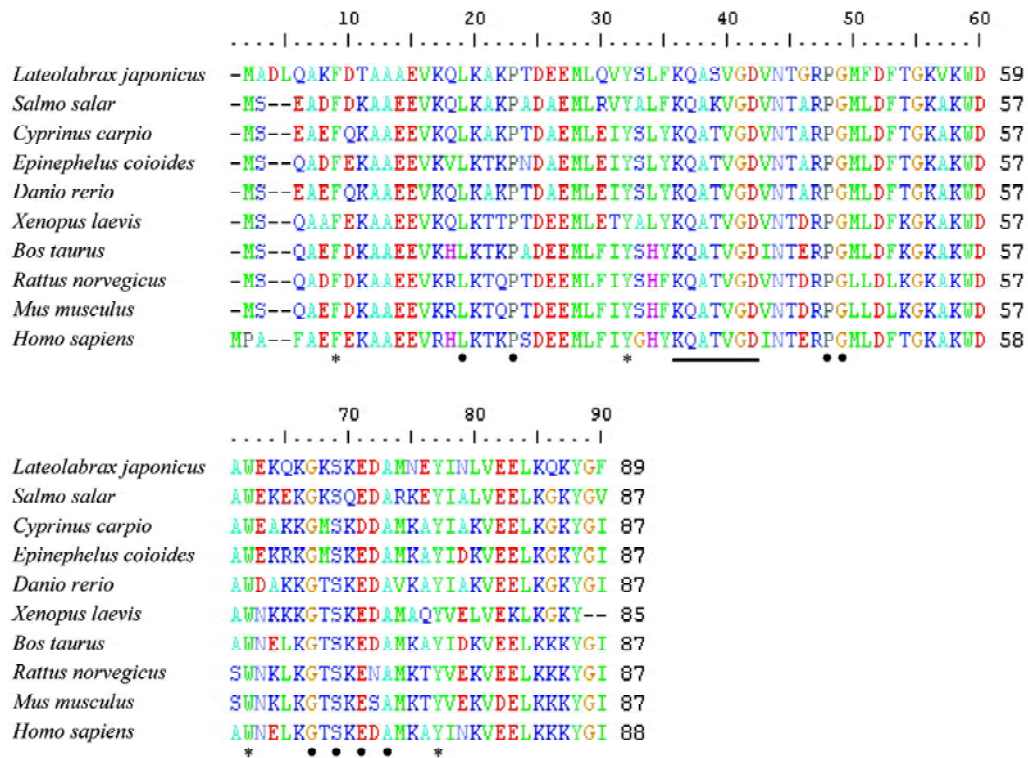


图2 鲈鱼 ACBP 蛋白与其他已知 ACBP 蛋白的同源性比对

脂酰基辅酶 A 的结合位点用下划线表示, 不同螺旋区的保守芳香氨基酸用星号标记, 螺旋转角区的保守氨基酸用黑点表示。

Fig.2 Homology Comparison of Sea Perch ACBP to other known ACBP proteins

Hydrophobic binding site for acyl-CoA esters is underlined, conserved aromatic residues in different helices are marked with stars and other conserved residues in the turn between helices marked with dots.

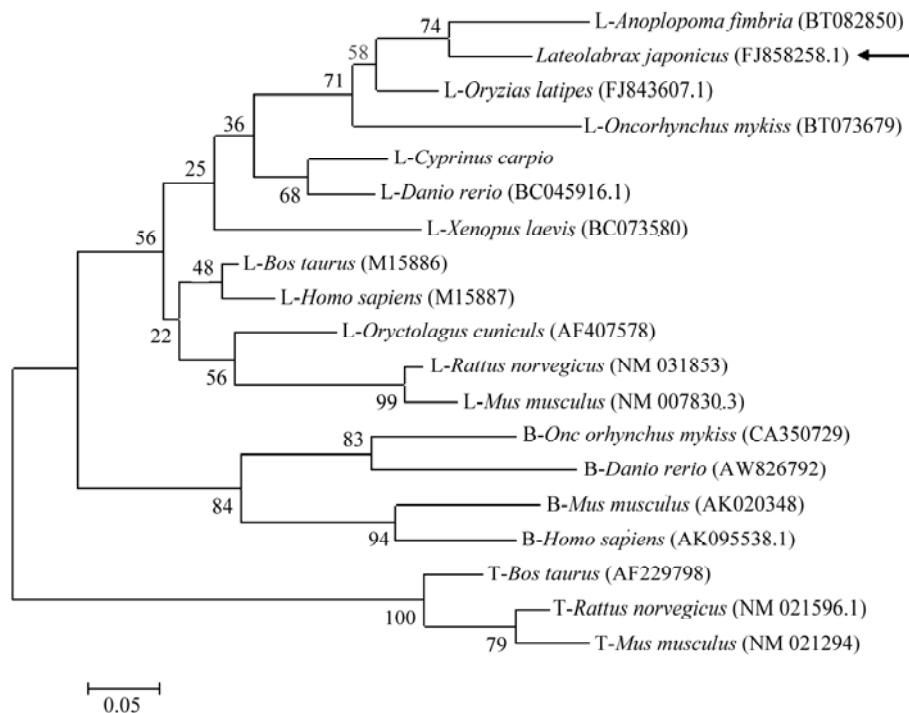


图3 不同生物的 ACBP 系统树

系统树用 MEGA (4.0) 软件 Neighbour-Joining 法构建, 系统树自展值为 1 000。箭头表示鲈鱼。

Fig.3 Phylogenetic tree of ACBP from different organisms

The phylogenetic tree was obtained using Neighbour-Joining method by MEGA (4.0). Bootstraps (1 000) were performed for the NJ tree. Arrow indicates Sea Perch.

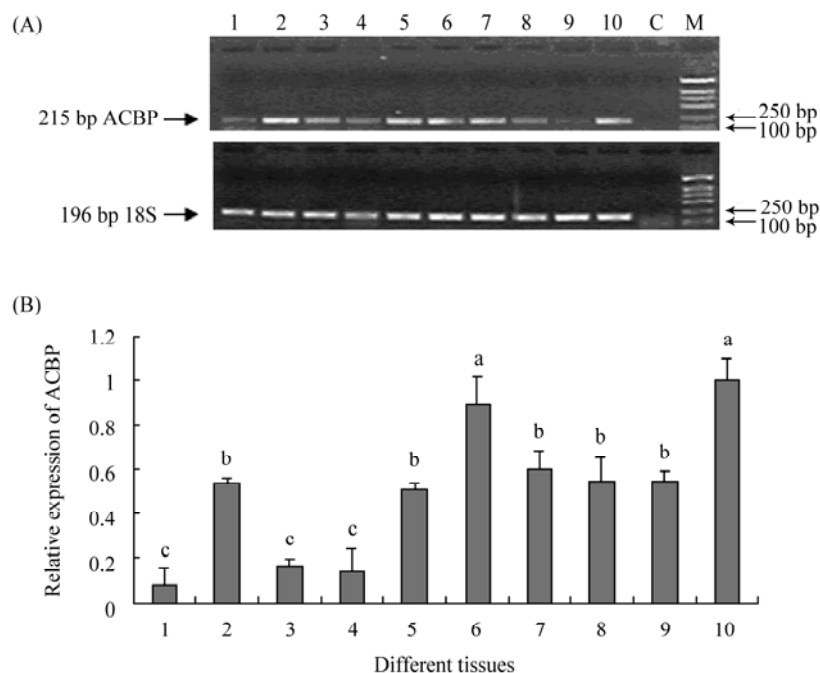


图4 RT-PCR (A)和实时定量 PCR (B)检测鲈鱼 *Acbp* 基因的组织表达

M: 标准分子量; 1: 肌肉; 2: 心脏; 3: 眼睛; 4: 大脑; 5: 肠; 6: 肾; 7: 脂肪组织; 8: 脾脏; 9: 鳃; 10: 肝脏; C: 对照。n=3, $P<0.05$ 。不同的上标字母表示差异显著。

Fig.4 The tissue expression profile of sea perch *Acbp* was determined by RT-PCR (A) and real-time PCR (B)

M: marker; 1: muscle; 2: heart; 3: eye; 4: brain; 5: intestine; 6: kidney; 7: fat; 8: spleen; 9: gill; 10: liver; C: control. n=3, $P<0.05$. a, b, c: different letters of superscript mean significant differences.

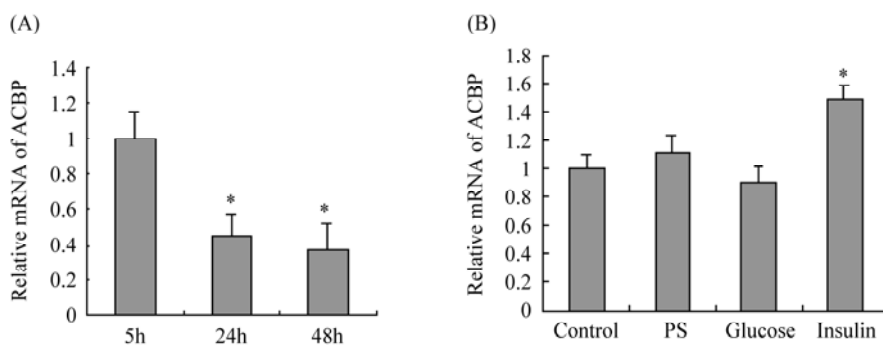


图5 鲈鱼肝脏 *Acbp* 诱导表达的实时定量 PCR 分析

A: 饥饿 5 h, 24 h 和 192 h 后 *Acbp* 的相对表达; B: 腹腔注射生理盐水(PS, 0.85%), 葡萄糖(2 g/kg)和胰岛素(10 U/kg)5 h 后 *Acbp* 的相对表达。n=4, $*P<0.05$, 代表差异显著。

Fig.5 The induced expression of sea perch *Acbp* in liver was determined by real-time PCR

A: relative expression of *Acbp* after fasted for 5 h, 24 h, 192 h; B: relative expression of *Acbp* 5 h after intraperitoneal injection of physiological saline (PS, 0.85%), Glucose (2 g/kg) and Insulin(10 U/kg). n=4, $*P<0.05$, significant difference.

3 讨论

ACBP是LCACoA的特异性高亲和力结合蛋白,在哺乳动物中,ACBP存在三种亚型,即L型、B型和T型。L-ACBP一般由86~92个氨基酸组成,序列中没有半胱氨酸,在各组织均有表达,主要表达在肝脏组织和表皮组织,尤其是分泌型细胞中含量很高;B-

ACBP最初是从鸭和青蛙的大脑中分离得到的,其序列中第43位为半胱氨酸,主要表达于大脑;而T-ACBP则主要表达在精巢,序列中含有3个半胱氨酸,鱼类、两栖类和鸟类缺乏T-ACBP^[6,7]。我们用RT-PCR结合RACE从鲈鱼肝脏分离到的*Acbp* cDNA全长序列共679 bp,该序列包含一270 bp开放阅读框,

推测编码89个氨基酸(无半胱氨酸), 与人和鱼类的L-ACBP 同源性为 68%~87%。聚类分析也表明, 鲈鱼 ACBP 和其他动物的 L-ACBP 成一组, 所以认为我们克隆的是鲈鱼 L 型 *Acbp* 基因。

哺乳动物 ACBP 由四个 α -螺旋束形成一个浅碗状的袋子结构, 该结构利于 LCACoA 的结合, LCACoA 与 ACBP 结合后, 辅酶 A 端象个盖子, 碳氢链则完全埋在 ACBP 疏水的口袋中^[8,9]。其中第 2 个 α -螺旋中的 KQATVGD 序列被认为是脂酰基辅酶 A 的疏水结合位点^[9]。从图 2 可见, 鲈鱼的该结构域位于 35~41 位, 但其中的 T 被 S 取代, 大西洋鲑的 T 则被 K 取代。另外, 位于不同的螺旋区域的许多芳香化氨基酸残基也很保守, 如 Phe⁸、Tyr³¹、Trp⁶¹ 和 Tyr⁷⁶(图 2 中带星号的氨基酸)。其他保守的氨基酸则位于螺旋的转角处, 如螺旋 1 和螺旋 2 之间的 Leu¹⁸ 和 Pro²²; 螺旋 2 和 3 之间的 Pro⁴⁷ 和 Gly⁴⁸; 螺旋 3 和 4 之间的 Gly⁶⁶、Ser⁶⁸、Glu⁷⁰ 和 Ala⁷²(图 2 中用下面带点表示)。

Acbp 在哺乳动物中是一个典型的管家基因, 在早期的胚胎形成阶段到成体的各个组织都有 *Acbp* 的分布, 最高的表达出现在白色或褐色脂肪组织以及肝脏, 其次是肾脏^[10-12]。鲈鱼 *Acbp* 的表达模式与哺乳动物基本一致, 在我们所检测的 10 种组织中均有表达, 高表达出现在肾脏和肝脏, 低表达则在肌肉、眼睛和大脑组织。在哺乳动物中, 虽然 *Acbp* 基因启动子较高的基本活性决定了其分布的广泛性, 但是肝脏 *Acbp* 的表达也受到代谢的调控, 如大鼠饥饿后其肝脏 *Acbp* 的表达量显著降低, 高脂食物则诱导 *Acbp* 的表达^[4]。在哺乳动物中已证明肝脏 *Acbp* 是 PPAR α 的目标基因, PPAR α 的配体-过氧化物酶体增殖激活剂(peroxisome proliferator)能诱导肝细胞 ACBP 的表达, 瞬时转染 PPAR α 能激活 *Acbp* 启动子^[12,13]。饥饿能增加 PPAR α 目标基因的表达, 但同样作为 PPAR α 目标基因的 *Acbp* 在饥饿时表达则降低^[4], 原因是 *Acbp* 基因受到 PPAR α 和 SREBP(sterol regulatory element-binding protein)的双重调控, 在饥饿时 PPAR α 激活, 所以 *Acbp* 表达量应该提高, 但是饥饿同时抑制了 SREBP-1c 的活性, 最终结果是降低了 *Acbp* 的表达^[13,14]。同样, 由于胰岛素能诱导并促使 SREBP-1c 结合到 *Acbp* 启动子的 SRE 部位, 在转录因子 SP1 和附属因子 NF-Y 共同作用下使得 *Acbp* 的表达增加^[14,15]。我们的研究表明, 饥饿能降低鲈鱼 L 型 *Acbp* mRNA 的表达, 而胰岛素则能诱导其表达, 该结果和对哺乳动物的研究结果一致, 但是其调控机制是否和哺乳动物一

样, 是否同样也受到 PPAR α 和 SREBP 的双重调控还有待于进一步研究。

参考文献(References)

- 1 Faergeman NJ, Knudsen J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* 1997; 323(1): 1-12.
- 2 Faergeman NJ, Wadum M, Feddersen S, Burton M, Burton BB, Knudsen J. Acyl-CoA binding proteins: structural and functional conservation over 2000 MYA. *Mol Cell Biochem* 2007; 299(1-2): 55-65.
- 3 Huang H, Atshaves BP, Frolov A, Kier AB, Schroeder F. Acyl-coenzyme A binding protein expression alters liver fatty acyl-coenzyme A metabolism. *Biochemistry* 2005; 44(30): 10282-97.
- 4 Bhuiyan J, Pritchard PH, Pande SV, Seccombe DW. Effects of high-fat diet and fasting on levels of acyl-coenzyme A binding protein in liver, kidney, and heart of rat. *Metabolism* 1995; 44: 1185-9.
- 5 Ren Q, Du ZQ, Zhao XF, Wang JX. An acyl-CoA-binding protein (FcACBP) and a fatty acid binding protein (FcFABP) respond to microbial infection in Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol* 2009; 27(6): 739-47.
- 6 Burton M, Rose TM, Faergeman NJ, Knudsen J. Evolution of the acyl-CoA binding protein. *Biochem J* 2005; 392(2): 299-307.
- 7 Chang JL, Tsai HJ. Carp cDNA sequence encoding a putative diazepam-binding inhibitor/ endozepine /acyl-CoA- binding protein. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1298(1): 9-11.
- 8 Andersen KV, Ludvigsen S, Mandrup S, Knudsen J, Poulsen FM. The secondary structure in solution of acyl-coenzyme A binding protein from bovine liver using 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 1991; 30(44): 10654-63.
- 9 Hach M, Pedersen SN, Borchers T, Hujrup P, Knudsen J. Determination by photoaffinity labeling of the hydrophobic part of the binding site for acyl-CoA esters on acyl-CoA-binding protein from bovine liver. *Biochem J* 1990; 271(1): 231-6.
- 10 Mandrup S, Hummel R, Ravn S, Jensen G, Andreassen PH, Gregersen N, et al. Acyl-CoA-binding protein/diazepam binding inhibitor gene and pseudogenes. A typical housekeeping gene family. *J Mol Biol* 1992; 228(3): 1011-22.
- 11 Knudsen J, Mandrup S, Rasmussen JT, Andreassen PH, Poulsen F, Kristiansen K. The function of acyl-CoA-binding protein (ACBP)/diazepam binding inhibitor (DBI). *Mol Cell Biochem* 1993; 123(1-2): 129-38.
- 12 Helledie T, Grontved L, Jensen SS, Kiilerich P, Rietveld L, Albrechtsen T, et al. The gene encoding the acyl-CoA-binding protein is activated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma through an intronic response element functionally conserved between humans and rodents. *J Biol Chem* 2002; 277(30): 26821-30.
- 13 Sandberg MB, Bloksgaard M, Duran-Sandoval D, Duval C, Staels B, Mandrup S. The gene encoding acyl-CoA- binding protein is subject to metabolic regulation by both sterol regulatory element- binding protein and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in hepatocytes. *J Biol Chem* 2005;

- 280(7): 5258-66.
- 14 Neess D, Kiilerich P, Sandberg MB, Helledie T, Nielsen R, Mandrup S. ACBP-a PPAR and SREBP modulated housekeeping gene. *Mol Cell Biochem* 2006; 284(1-2): 149-57.
- 15 Swinnen JV, Alen P, Heyns W, Verhoeven G. Identification of diazepam-binding Inhibitor/ Acyl-CoA-binding protein as a sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. *J Biol Chem* 1998; 273(32): 19938-44.

Cloning and Induced Expression of Acyl-CoA Binding Protein Gene from Sea Perch *Lateolabrax japonicus*

Yun-Xia Qian*, Sun-Xiao Yang, Li-Juan Tong, Juan-Juan Song, Lun Qian

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Acyl-CoA-binding protein (ACBP) has been proposed to play a pivotal role in the intracellular trafficking and the utilization of long-chain fatty acyl-CoA esters. Full-length cDNA coding for *Lateolabrax japonicus* ACBP was isolated from liver total RNA by RACE techniques. It was shown to be 679 bp, which included a 83 bp of 5'-untranslated region (UTR), a 326 bp 3'-UTR and a 270 bp open reading frame (ORF). The deduced ACBP was comprised of 89 amino acids with a theoretical isoelectric point of 5.44 and molecular weight of 10.14 kDa. The amino acid sequence comparison of ACBPs showed that *Lateolabrax japonicus* shared 87%, 84%, 78% and 68% identity with Medaka, sablefish, Atlantic salmon and human, respectively. Semi-quantitative RT-PCR and real-time PCR were used to characterize the expression profile of *Acbp*. The results showed that *Lateolabrax japonicus Acbp* was expressed in all ten tissues tested (muscle, heart, eye, brain, gill, liver, intestine, kidney, fat and spleen) with highest expression in kidney and liver, lowest in muscle, eye and brain. The *Acbp* expression in sea perch liver is down-regulated by fasting, up-regulated by insulin but not glucose.

Key words acyl-CoA-binding protein (ACBP); sea perch (*Lateolabrax japonicus*); clone; expression

Received: May 18, 2010 Accepted: August 16, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30671608)

*Corresponding author. Tel: 86-574-87600169; E-mail: qianyunxia@nbu.edu.cn