

李信,高坚. 泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 基因克隆、表达及其延长活性分析[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(2): 71-81.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.02.010.

泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 基因克隆、表达及其延长活性分析

李信,高坚

华中农业大学水产学院/农业动物遗传育种与繁育教育部重点实验室/
农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070

摘要 为探究泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)脂肪酸延长酶2和延长酶5基因(*elovl2*, *elovl5*)在长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)合成中的作用,克隆获得泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 基因 cDNA 全长序列,分析其在泥鳅不同组织中的表达规律;通过酵母体外表达验证其延长活性;并投喂以鱼油(FO)、亚麻籽油(CO)和大豆油(SO)为脂肪源的饲料8周,分析不同脂肪源对泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 表达的影响。结果显示,泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 的开放阅读框(ORF)分别为888 bp和876 bp,编码295和291个氨基酸。系统进化树分析表明泥鳅 ELOVL2、ELOVL5 和斑马鱼的同源性最近。序列比对分析 ELOVL2 和 ELOVL5 保守性较高,都具有长链脂肪酸延伸酶的特殊结构。泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 均在肝组织中表达量最高。酵母功能验证结果表明泥鳅 ELOVL2 主要延长 C20-22 PUFA,而 ELOVL5 主要延长 C18-20 PUFA,对 C22 PUFA 没有延长作用。不同饲料脂肪源投喂试验结果显示,CO 组泥鳅肝脏和肌肉 n-3 PUFA 含量显著上升,肌肉 20:5n-3 含量显著升高,但肝脏和肌肉 22:6n-3 含量没有显著变化。CO 组泥鳅肝组织中 *elovl2*、*elovl5*、*scd* 和 *srebp-1c* 的表达量也显著上升。综上所述,泥鳅 ELOVL2 和 ELOVL5 在 LC-PUFA 合成中具有重要作用,饲料中 CO 添加可促进泥鳅 n-3 PUFA 的积累。

关键词 泥鳅;长链多不饱和脂肪酸;延长酶2;延长酶5;脂肪源

中图分类号 Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)02-0071-11

长链高度不饱和脂肪酸(long-chain polyunsaturated fatty acid, LC-PUFA)是指双键数 ≥ 3 且碳原子数 ≥ 20 的直链脂肪酸,主要包括花生四烯酸(20:4n-6, ARA)、二十碳五烯酸(20:5n-3, EPA)和二十二碳六烯酸(22:6n-3, DHA)^[1]。LC-PUFA 在维持细胞膜的流动性、促进动物生长、增强免疫、提升抗氧化能力、减轻炎症反应以及脂肪代谢等方面发挥着重要的作用^[2-4]。研究表明,淡水鱼可以通过脂肪酸去饱和作用(去饱和酶)和碳链延长作用(延长酶)将 C18 的亚油酸(18:2n-6, LA)和亚麻酸(18:3n-3, ALA)延长为 C20-22 的 LC-PUFA,而海水鱼合成 LC-PUFA 能力不足,需要从食物中摄取^[5]。

目前,长链脂肪酸延长酶(elongase of long-chain fatty acid)基因家族被发现有 *elovl1-7*,分别作用于不同的脂肪酸底物^[6-7]。ELOVL1、ELOVL3、ELOVL6 和 ELOVL7 参与饱和脂肪酸

和单不饱和脂肪酸的延长,而 ELOVL2、ELOVL4 和 ELOVL5 参与多不饱和脂肪酸的延长^[8-10]。合成 LC-PUFA 的关键延长酶是 ELOVL2 和 ELOVL5^[11]。多数鱼类 ELOVL2 被证实主要延长 C20-22 PUFA^[12]。斑马鱼(*Danio rerio*)ELOVL2 可以延长 C18 和 C24 脂肪酸^[13],ELOVL5 主要延长 C18-20 PUFA 底物,对 C22 的延伸效率低^[14]。

对不同鱼类脂肪酸合成代谢的研究表明,环境和食物影响着物种间 LC-PUFA 的合成能力^[15]。富含 C18 PUFA 的植物油一般可促进鱼类 PUFA 生物合成,而富含 PUFA 的鱼油则抑制其合成^[16]。相比大豆油,亚麻籽油富含更多的 ALA^[17],研究表明亚麻籽油可以提高鱼体内 LC-PUFA 的累积且对鱼的健康和生长性能没有影响^[18]。食物中高水平的亚麻籽油会改善大西洋鲑 n-6/n-3 的比例,提高 n-3 LC-PUFA 的合成能力^[19]。

收稿日期:2019-04-02

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31872579)

李信,硕士研究生。研究方向:水产动物营养与饲料学。E-mail: 1912966009@qq.com

通信作者:高坚,博士,教授。研究方向:水产动物营养与饲料学。E-mail: gaojian@mail.hzau.edu.cn

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*),属于鲤形目、鳅科、泥鳅属,是一种广泛分布在底栖的鱼类。由于其高营养和药用价值,具有“水中人参”的美誉^[20],已成为我国水产养殖主要品种之一。笔者所在研究室已克隆出泥鳅 *elovl1*、*elovl3*、*elovl4*、*elovl6*,并分析了其分子表征^[21-23]。本研究从泥鳅肝组织中克隆获得 *elovl2* 和 *elovl5* cDNA 序列,分析它们在分子表征、组织表达上的差异,并采用体外酵母转录来验证其对不同脂肪酸底物的延长活性。通过投喂不同脂肪源饲料,探究泥鳅不同组织脂肪酸含量和脂肪酸合成相关基因表达的变化,旨在为了解泥鳅 ELOVL2 和 ELOVL5 在长链多不饱和脂肪酸合成中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 基因克隆及表达分析

从湖北鄂州市获得成年野生泥鳅(体质量约 20 g),并保持在恒温(25±1)℃的水族缸,饲养条件参考文献^[21]。采用流式细胞仪(CyAn ADP,美国)测量泥鳅的倍性,方法参照 Liang 等^[24]。取健康成年泥鳅 10 种组织(肝、脾、肾、肌肉、肠、脑、眼、鳃、皮肤、性腺),迅速投入液氮冷冻,提取各组织 RNA 并反转录成 cDNA,参照文献^[21]方法。泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 的核心序列根据已获得的转录组数据(NCBI Short Read Archive:SRP082344)获取^[25],根据核心序列设计 3'端和 5'端的 RACE 特异性引物(表 1),通过 RACE 法克隆 *elovl2* 和 *elovl5* 的 cDNA 序列,方法参照张义凤等^[21]。利用 DNAMAN 软件将转录组获得的 *elovl2* 和 *elovl5* 核心序列和 RACE 法克隆所获得的 3'和 5'区域拼接得到 *elovl2* 和 *elovl5* 全长序列。利用网站 ORF (open reading frame) Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 寻找泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 开放阅读框,利用 NCBI 网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 验证和翻译序列。将泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 与 GenBank 中已经报道过的其他生物种类的基因在 BioEdit 软件上做多序列比对。利用 MEGA 6.0 软件,使用邻位相连(neighbor-joining, NJ)法构建系统进化树。RT-PCR 分析参照 Liang 等^[26]的方法,以 β -actin 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算每条基因的相对表达水平。所用引物序列见表 1。

1.2 泥鳅 ELOVL2 和 ELOVL5 的功能验证

分别扩增带有酶切位点 *EcoR* I (正向)和 *Xho* I (反向)泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 开放阅读框(ORF)的基因序列,引物详情见表 1。将目的基因导入到 pMD-19 载体,用双酶切法剪切载体获得目的片段,用 T4 连接法将目的基因转入到 pYES2 载体,通过测序验证后,用 Invitrogen 公司 S.C Easy Comp Transformation Kits 试剂盒将目的基因导入到酿酒酵母中,通过 Western-blot 验证重组蛋白正确表达。在酵母培养基中添加不同浓度脂肪酸, C18 和 C20 脂肪酸分别添加 0.5 mmol/L 和 1 mmol/L,添加脂肪酸有 18:2n-6、18:3n-3、18:3n-6(α 亚油酸;GLA)、20:4n-6、20:5n-3,在 30℃ 下培养 48 h 后,从酵母细胞中提取总脂肪酸,参照 Yan 等^[23]方法。脂肪酸转化效率计算公式为:[延长产物面积/(延长产物面积+外源添加脂肪酸面积)]×100^[21]。

1.3 不同脂肪源投喂对泥鳅脂肪酸组成和基因表达的影响

泥鳅饲料配方的设计参照高坚等^[27]。分别添加 3 种含有不同脂肪酸的油脂,即鱼油(FO)、亚麻籽油(CO)和大豆油(SO),油脂的添加量为 10%。微粒子饲料(0.1~0.3 mm)的制作方法参照 Gao 等^[28],饲料于-20℃冰箱保存备用。饲料配方见表 2,其中维生素预混料成分(mg/kg): β -胡萝卜素, 32.12; Vc, 230; VD₃, 3.24; VK₃, 15.28; VE, 12.68; VB₁, 19.24; VB₂, 64.12; VB₆, 15.28; VB₁₂, 0.04; VH, 1.92; 纤维素, 1 283.04; 烟酸, 256.56; 泛酸钙, 89.34; 叶酸, 4.8; 氯化胆碱, 2 623.12; 对氨基苯甲酸, 127.76; 矿物质预混料成分(mg/kg): MgSO₄, 3 380; Na₂HPO₄, 53.33; K₂HPO₄, 5 913.33; Fe, 733.33; Ca, 8 060; Al(OH)₃, 6.67; ZnSO₄, 86.67; CuSO₄, 2.67; MnSO₄, 20; Ca(IO₃)₂, 6.67; CoSO₄, 26.67。脂肪酸组成见表 3。投喂试验选择用野生泥鳅繁殖的幼鱼,初始体质量为每尾(0.60±0.04)g。将泥鳅置于养殖系统中(水量 40 L),每缸 15 尾泥鳅,随机分为 3 组,每组 3 个平行。每天饱食投喂 3 次,时间依次为 08:00、14:00 和 20:00。每天记录鱼的摄食和死亡情况,饲喂颗粒大小根据鱼嘴大小进行调整。整个饲养试验中水温控制在(25±1)℃,溶氧 5.2~7.0 mg/mL,试验持续 8 周。取样时,测量每尾泥鳅的体质量,每个水族箱取 3 尾泥鳅肝脏保存在液氮中备用,用于提取 RNA;取 3 尾泥

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of the primers for PCR

目标基因 Target genes	引物序列 Primer sequences (5'-3')	温度/℃ Temperature
部分 cDNA 序列克隆 Partial cDNA cloning		
<i>elovl2</i> -f	AGGGTTGCAAAAGTCCTCTGG	66.5
<i>elovl2</i> -r	AACCAGCTGAGCCTGGGTGAG	64.0
<i>elovl5</i> -f	CTGTGGTGGTATTACTTCTCC	59.0
<i>elovl5</i> -r	ACTTTTTCCACCACAGATATG	60.5
3'-RACE		
<i>elovl2</i> -3-F	GGACAAAGTTTCTTTGGG	52.0
<i>elovl2</i> -3-R	CAGCTGAGCCTGGGTGAG	55.0
<i>elovl5</i> -3-F	TATCATCACGCCACCATG	54.0
<i>elovl5</i> -3-R	CGGAACAGCAGACAGCCC	59.0
5'-RACE		
<i>elovl2</i> -3-F	TGTGCTGAGGAAGAAAAA	50.0
<i>elovl2</i> -3-R	GAATGTGGATGAACTGT	51.0
<i>elovl5</i> -3-F	CTTGAGGAAGAACAGCCA	54.0
<i>elovl5</i> -3-R	TGCACCAAAATATGAGTG	52.0
开放阅读框克隆 ORF cloning		
<i>elovl2</i> -pyes2/ct-F	GGAATTCATGAACCATTTTGAAGC	63.5
<i>elovl2</i> -pyes2/ct-R	CCGCTCGAGCTGTGCCTTCTGTTAAAGTTGGC	67.5
<i>elovl5</i> -pyes2/ct-F	GGAATTCGATAAAGGGTTGAAGATGG	64.5
<i>elovl5</i> -pyes2/ct-R	CCGCTCGAGATCTGTGCGTGGTTTTCTGTGTTT	67.0
RT-PCR		
<i>β-actin</i> -F	TTACCCACACCGTGCCCATCTAC	60.0
<i>β-actin</i> -R	TACCGCAAGACTCCATACCCA	60.0
<i>gapdh</i> -F	ACCAACTGCTTGGCTCCCC	60.0
<i>gapdh</i> -R	GGAATGACTTTGCCACG	60.0
<i>elovl2</i> -F	ATGGTCACACTTGTATCCT	60.0
<i>elovl2</i> -R	ATCGCTGCTATTACACTACT	60.0
<i>elovl5</i> -F	CACACTAATCTTGCTCTTCAC	60.0
<i>elovl5</i> -R	GCTGCTCTACTACATTGGTT	60.0
<i>sreb-1c</i> -F	ATACCAGAAGCAGCAGAGT	60.0
<i>sreb-1c</i> -R	CCAGAAGAGGACCGATGAT	60.0
<i>ppar-γ</i> -F	CGCCATTCGTTTTTGGTCG	60.0
<i>ppar-γ</i> -R	GCATGTGCGTGCTCTTTCC	60.0
<i>scd</i> -F	CCAAGATGATGAGCAAGAAG	60.0
<i>scd</i> -R	CTGATGAAGAAGAGGAGTGA	60.0

表 2 饲料配方			
Table 2 Composition of the basal diet		g/100 g	
成份 Component	组别 Diet groups		
	鱼油 FO	亚麻芥油 CO	大豆油 SO
脱脂鱼粉 ^a	6	6	6
Defatted fish meal			
磷虾粉 Krill meal	2	2	2
大豆分离蛋白	16	16	16
Soybean concentrate			
豆粕 Soybean meal	25	25	25
小麦粉 Wheat meal	15	15	15
α 淀粉 α-Starch	8	8	8
谷朊粉 Wheat gluten meal	6	6	6
鱼油 Fish oil	10	0	0
亚麻芥油 ^b	0	10	0
Camelina oil			
大豆油 Soybean oil	0	0	10
酵母粉 Yeast meal	6	6	6
维生素预混料	3	3	3
Vitamin mix			
矿物质预混料	3	3	3
Mineral mix			

注 Note:a: 100% 乙醚脱脂 100% ether degreasing; b: 亚麻籽油是实验室用亚麻籽籽榨取 Camelina oil was extracted from camelina seeds in the laboratory.

鳅保存在 -80 ℃,用于提取脂质;剩余泥鳅取肝脏和肌肉组织 200 mg,保存在 -80 ℃ 用于脂肪酸分析。泥鳅脂质的提取方法参照 Gao 等^[28]。饲料、泥鳅肝组织、肌肉组织根据 Li 等^[29]描述的方法进行甲酯化,提取脂肪酸。使用气相色谱仪(GC-2010 Plus)鉴定和定量脂肪酸甲基酯种类。每种脂肪酸含量计算公式为:该种脂肪酸出峰面积/总脂肪出峰面积×100。

1.4 数据分析

试验数据以平均值±标准误差(mean±SE)表示,采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(One way ANOVA),用 Duncan's 多重比较来确定各试验组间差异的显著性,显著水平为 α=0.05。

2 结果与分析

2.1 泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 基因的克隆、系统进化

和序列比对分析

泥鳅 *elovl2* (GenBank 登录号:MK715488)和

表 3 饲料脂肪酸组成(占总脂肪酸的百分比)

Table 3 Fatty acid composition (percentage of total fatty acids) of experimental diets

脂肪酸 Fatty acid	试验组 Experimental diet		
	FO	CO	SO
14 : 0	5.0±0.1	0.5±0.0	0.6±0.1
16 : 0	11.4±0.1	8.0±0.1	13.6±0.2
18 : 0	2.1±0.1	2.5±0.1	3.5±0.2
总 SFA Total SFA	17.5±0.3	11.7±0.2	17.7±0.3
16 : 1n-7	7.2±0.1	1.9±0.1	2.7±0.8
18 : 1n-9	14.5±0.2	14.8±0.1	24.3±0.2
20 : 1n-9	11.2±0.7	12.3±0.1	2.9±0.0
22 : 1n-11	0.3±0.1	0.2±0.0	0.1±0.0
总 MUFA Total MUFA	34.4±0.8	30.1±0.4	30.7±0.8
18 : 2n-6	8.8±0.6	20.7±0.2	40.1±0.5
18 : 3n-6	0.3±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
20 : 3n-6	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0
20 : 4n-6	8.3±0.2	0.4±0.1	1.1±0.0
总 n-6 Total n-6	18.2±0.2	22.6±0.2	42.0±0.5
18 : 3n-3	2.1±0.1	29.7±0.5	7.0±0.1
18 : 4n-3	2.6±0.1	0.8±0.0	0.2±0.0
20 : 4n-3	0.6±0.1	0.4±0.0	0.2±0.0
20 : 5n-3	13.2±0.4	1.3±0.1	0.8±0.1
22 : 5n-3	1.2±0.2	0.2±0.1	0.2±0.1
22 : 6n-3	9.1±0.7	1.3±0.1	1.1±0.2
总 n-3 Total n-3	30.7±0.9	35.6±0.5	9.2±0.2
n-3/n-6 PUFA	1.7±0.1	1.6±0.1	0.2±0.0
总 PUFA Total PUFA	48.9±1.0	58.2±0.6	51.6±0.7

注:含量较少的脂肪酸(如 C20 : 0、C22 : 0、C22 : 4n-6)未列入表中; SFA: 饱和脂肪酸, MUFA: 单不饱和脂肪酸, PUFA: 多不饱和脂肪酸。表中数据为 3 个平行的平均值。Note: Some fatty acids, of which the contents are minor, trace amount or not detected (such as C20 : 0, C22 : 0, C22 : 4n-6) were not listed in the table; SFA: saturated fatty acid, MUFA: monounsaturated fatty acid, PUFA: polyunsaturated fatty acids. Values represent mean±SD of three replicates.

elovl5 (GenBank 登录号: MK715487) 的开放阅读框分别由 888 bp 和 876 bp 组成, 编码 295 和 291 个氨基酸。系统进化树(图 1)显示, 泥鳅 ELOVL2 与斑马鱼 ELOVL2 亲缘性最接近, 其次是其他鲤科鱼类, 与大西洋鲑 (*Salmo salar*) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 等其他鱼类亲缘性较远, ELOVL2 与哺乳动物延长酶在不同的分支上聚类。与 ELOVL2 相似, 泥鳅 ELOVL5 与斑马鱼 ELOVL5 亲缘性最近, 相似性为 98%, 紧随其后的是鲤 (*Cyprinus carpio*), 与哺乳动物亲缘关系较远。选择斑

马鱼、鲤、大西洋鲑、小鼠、人和其他鱼类进行序列比对分析(图 2, 图 3), 结果显示, 这些延长酶的氨基酸序列具有长链脂肪延长酶的显著特征, 包括多个跨膜区域, 保守的基序, 如 KxxExxD_T、QxxFLHxY-HHxxHH、NxxxHxxMYxYY 和 TxxQxxQ; 赖氨酸和精氨酸残基都位于 C 端附近, 这可能作为内质网(ER)保留信号。

2.2 泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* mRNAs 组织表达分析

RT-PCR 结果显示泥鳅 *elovl2* 基因在肝脏中表达量显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 其次是脑组织, 表达量显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 其他组织之间表达量无显著差异(图 4)。*elovl5* 基因在大脑、肾脏、性腺和肝脏中高表达, 肝脏中转录水平最高, 显著高于其他组织 ($P < 0.05$)。大脑、肾脏、性腺的表达量显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 其他组织之间表达量无显著差异。

2.3 泥鳅 ELOVL2 和 ELOVL5 的延伸功能

通过酿酒酵母表达系统测定泥鳅 ELOVL2 和 ELOVL5 对不同脂肪酸底物的转化能力。结果表明, 泥鳅 ELOVL2 对 C18 的脂肪酸底物活性较低(图 5B、C), 对 C20 和 C22 底物活性较高(图 5G、H), 并没有检测到 18 : 2n-6 的延伸产物(图 5A)。ELOVL5 对 C18-20 的 FA 底物有活性, 对 C18 的转化率最高(图 5D、E、F), 对 C20 的转化率较低(图 5I、J), 但不能延伸 C22 的底物。当底物为 LA 时, 泥鳅 ELOVL5 能延伸到 20 : 2n-6, 转化率为 3.69%。底物为 18 : 3n-6 时, 转化率为 58.10%, 延伸产物为 20 : 3n-6。泥鳅 ELOVL5 可以延伸 ALA 到 20 : 3n-3, 转化率为 8.69% (表 4)。当底物为 C18 时, ELOVL2 延长 ALA 至 20 : 3n-3 (0.84%) 和 18 : 3n-6 至 20 : 3n-6 (1.18%)。在底物为 C20 脂肪酸时, ELOVL5 可以延伸 AA 和 EPA 至 22 : 4n-6 和 22 : 5n-3, 转化率分别为 8.01% 和 13.33% (表 4)。ELOVL2 可以延长 AA 到 22 : 4n-6 和 24 : 4n-6, 转化率分别为 8.98% 和 3.39%。当底物为 EPA 时, 可以延长到 22 : 5n-3 和 24 : 5n-3, 转化率分别为 6.76% 和 2.13% (表 4)。

2.4 不同油脂饲料投喂对泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 基因表达及组织脂肪酸组成的影响

采用 3 种不同油脂饲料投喂泥鳅, 探索饲料中

添加不同 PUFA 对泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 表达及组织脂肪酸组成的影响。投喂结束后,各试验组泥鳅平均体质量分别为 (0.96 ± 0.04) g(FO 组)、 (1.01 ± 0.02) g(CO 组)、 (1.02 ± 0.02) g(SO 组),各组间无显著性差异;鱼体脂质含量分别为 23.6%(FO 组)、22.4%(CO 组)、21.4%(SO 组),各组间无显著性差异。试验饲料的脂肪酸组成显示,FO 试验组中富含 C20 和 C22 脂肪酸,主要 PUFA 含量分别为 AA(8.8%)、EPA(13.2%)和 DHA(9.1%)。CO 组饲料富含 ALA(20.7%)。SO 组饲料 LA 和 ALA 含

量分别为 40.1%和 7.2%。在投喂结束后,泥鳅肝脏脂肪酸组成(表 5)中,CO 和 SO 试验组 n-6 PUFA 含量都显著($P < 0.05$)高于 FO 组,但两组之间没有差异,而 SO 组 n-6 PUFA 含量是显著高于 CO 组。相比其他组,CO 组 ALA 含量(10.1%)显著上升($P < 0.05$)。在 CO 组中,泥鳅总 n-3 PUFA 含量上升,与 FO 组没有显著性差异。而肌肉中的脂肪酸含量(表 5)也有相应的趋势,CO 试验组的 n-3 PUFA 含量显著($P < 0.05$)上升。

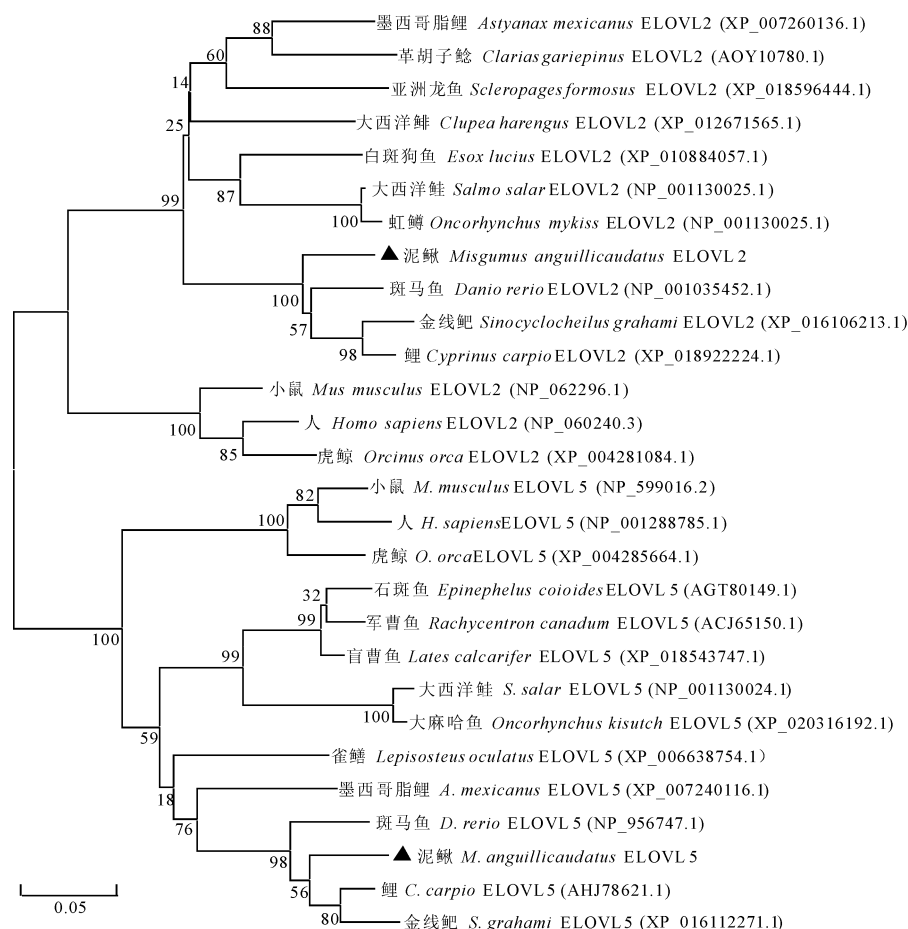
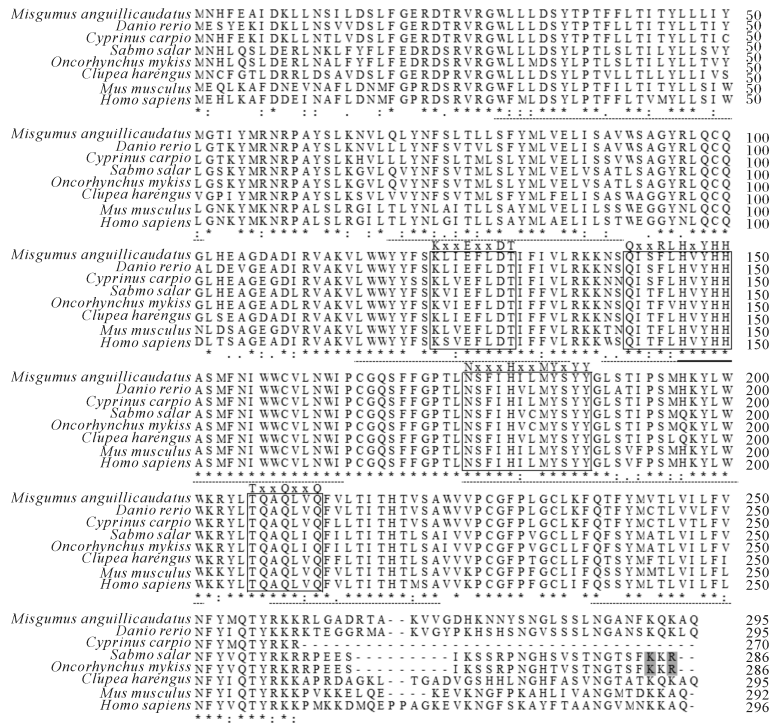


图1 泥鳅 ELOVL2 和 ELOVL5 系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree analysis of loach ELOVL2 and ELOVL5



图中相同与相似的氨基酸残基分别用‘*’与‘.’显示,用虚线表示氨基酸的跨膜区,保守基序用方框标记,组氨酸盒用实线下划线标记,靠近 C 末端的赖氨酸(K)或精氨酸(R)残基用灰色阴影标记,下同。The same and similar amino acid residues in the figure were shown with ‘*’ and ‘.’ respectively, the transmembrane region of the amino acid was represented by dotted line, the conserved motif was marked with square, the histidine box was marked with solid line, and the lysine (K) or arginine (R) residues near the C-terminal were marked with gray shadow, the same as below.

图 2 ELOVL2 氨基酸序列比对

Fig.2 The analysis of amino acid sequences of ELOVL2

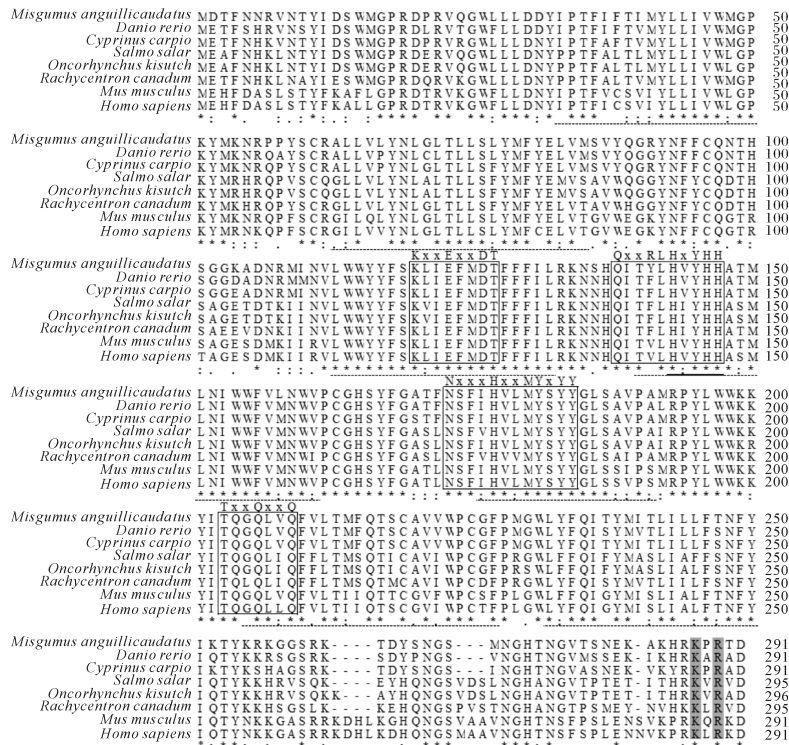
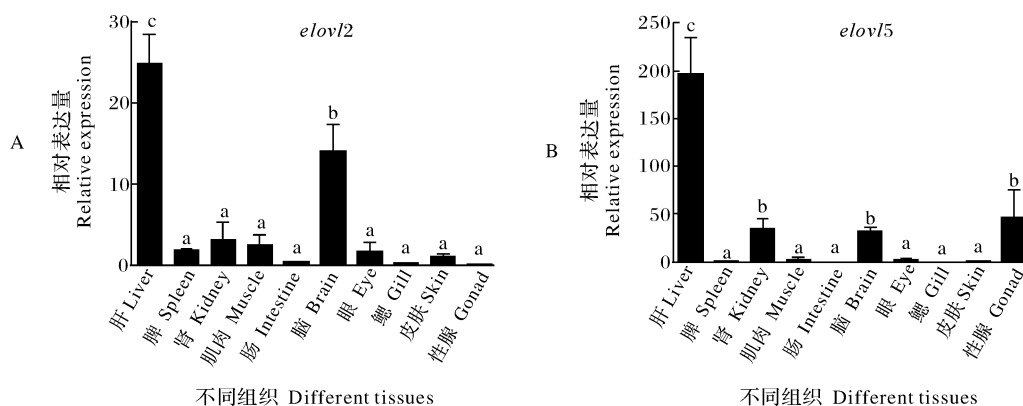


图 3 ELOVL5 氨基酸序列比对

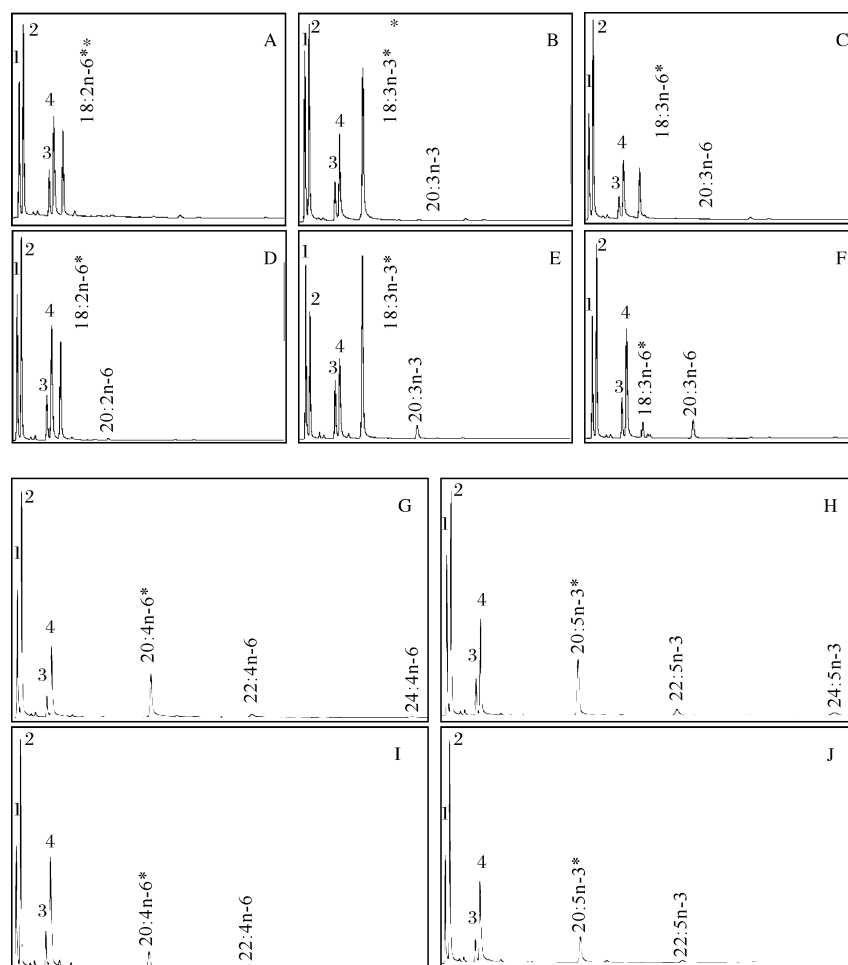
Fig.3 The analysis of amino acid sequences of ELOVL5



误差棒上方不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Different letters above the error bars indicate significant differences ($P < 0.05$).

图4 泥鳅 *elovl2* (A) 和 *elovl5* (B) 基因在不同组织中的相对表达量

Fig.4 The relative expression of loach *elovl2* (A) and *elovl5* (B) genes in different tissues



A,B,C,G,H 为导入了 *elovl2* 基因的酵母, D,E,F,I,J 为导入了 *elovl5* 基因的酵母。酵母自身的脂肪酸分别是: 1.16 : 0.2.16 : 1n-7, 3.18 : 0.4.18 : 1n-9, 图中带 * 为添加的脂肪酸, 其他为延伸后的脂肪酸。A,B,C,G,H are yeast with *elovl2* gene and D,E,F,I,J are yeast with *elovl5* gene. The fatty acids of yeast themselves are: 1.16 : 0.2.16 : 1n-7, 3.18 : 0.4.18 : 1n-9. The fatty acids with in the figure are added and the others are extended fatty acids.

图5 泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 基因酵母体内提取的脂肪酸色谱图

Fig.5 Chromatogram of fatty acids methyl esters (FAMES) extracted from yeast transformed with the coding sequences of loach *elovl2* and *elovl5* genes

表 4 泥鳅 ELOVL2 和 ELOVL5 对脂肪酸的延长作用

Table 4 Effects of loach ELOVL2 and ELOVL5 on fatty acid elongation

脂肪酸底物 FA substrate	产物 Product	转化率/% Conversion		活力 Activity
		ELOVL5	ELOVL2	
18 : 2n-6	20 : 2n-6	3.69±1.40	0.0	C18→20
	22 : 2n-6	0.00	0.00	C20→22
	合计 Total	3.69	0.00	
18 : 3n-3	20 : 3n-3	8.69±0.46	0.84±0.14	C18→20
	22 : 3n-3	0.30	0.00	C20→22
	合计 Total	8.69	0.98	
18 : 3n-6	20 : 3n-6	58.10±3.70	1.18±0.34	C18→20
	22 : 3n-6	0.00	0.00	C20→22
	合计 Total	58.10	1.18	
20 : 4n-6	22 : 4n-6	8.01±2.39	8.98±0.60	C20→22
	24 : 4n-6	0.00	3.39±0.79	C22→24
	合计 Total	8.01	12.37	
20 : 5n-3	22 : 5n-3	13.33±3.98	6.76±0.21	C20→22
	24 : 5n-3	0.00	2.13±0.96	C22→24
	合计 Total	13.33	8.89	

表 5 泥鳅肝脏和肌肉脂肪酸组成(占总脂肪酸的百分比)

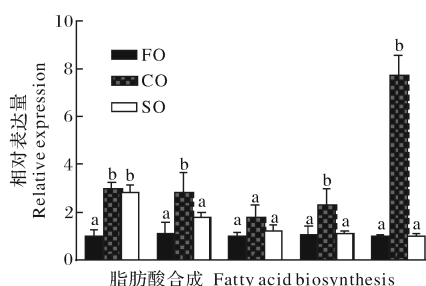
Table 5 Fatty acid composition (percentage of total fatty acids) of loach liver and muscle

%

脂肪酸 Fatty acids	肝脏 Liver			肌肉 Muscle		
	FO	CO	SO	FO	CO	SO
14 : 0	2.6±0.2	2.6±0.1	2.8±0.2	1.9±0.2	2.3±0.3	2.0±0.1
16 : 0	8.8±0.2b	6.8±0.4a	6.2±0.3a	13.9±0.6b	9.9±0.4a	10.5±0.3a
18 : 0	10.8±0.5a	14.1±0.2b	15.3±0.5b	3.6±0.3a	4.4±0.2b	4.5±0.1b
20 : 0	2.6±0.1b	2.2±0.1a	2.3±0ab	1.3±0.1a	2.4±0.2b	1.1±0.1a
22 : 0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.6±0.1a	2.0±0.1b	1.2±0.1ab
Total SFA	25.4±0.5	26.2±0.4	27.1±0.5	21.8±0.6b	21.3±0.4ab	19.7±0.3a
16 : 1n-7	7.8±0.4b	5.5±0.3a	4.8±0.4a	8.3±0.5b	6.8±0.4a	5.3±0.3a
18 : 1n-9	16.9±0.4b	14.2±0.3a	17.9±0.5b	17.9±0.6b	14.1±0.4a	15.2±0.3a
20 : 1n-9	2.7±0.1a	2.8±0a	3.8±0.2b	10.5±0.5b	9.8±0.6b	4.6±0.4a
22 : 1n-11	0.2±0.0b	0.2±0.0b	0.1±0.0a	0.5±0.1	1.2±0.2	1.7±0.2
Total MUFA	28.2±0.5b	23±0.3a	27.8±0.5b	37.5±0.7b	32.4±0.6ab	29.3±0.4a
18 : 2n-6	6.5±0.1a	11.0±0.2b	16.3±0.2c	8.6±0.4a	12.4±1.5b	23.7±2.6c
18 : 3n-6	2.0±0.0	1.9±0.1	2.4±0.0	0.8±0.1	1.1±0.1	0.9±0.2
20 : 2n-6	1.7±0.1a	2.3±0.3b	2.4±0.1b	1.5±0a	2.0±0.1b	1.8±0.1b
20 : 3n-6	3.5±0.1	4.1±0.2	3.8±0.3	3.3±0.3a	3.9±0.1b	3.1±0.1a
20 : 4n-6	2.4±0.2	3.9±0.3	3.3±0.3	3.6±0.1a	4.9±0.2b	3.9±0.2a
22 : 5n-6	0.1±0.0	0.1±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	0.4±0.1	0.3±0.1
Total n-6	16.7±0.2a	23.6±0.3b	28.6±0.4b	19.8±0.4a	25.3±0.3b	34.1±0.2c
18 : 3n-3	2.8±0.1a	10.1±0.2b	2.8±0.3a	3.6±0.2a	9.0±0.4c	6.1±0.4b
18 : 4n-3	2.6±0.2a	4.1±0.1b	2.1±0.0a	2.3±0.3b	2.1±0.3b	1.4±0.1a
20 : 4n-3	5.5±0.1b	5.6±0.3b	3.6±0.2a	1.9±0.1a	2.2±0.2a	3.0±0.1b
20 : 5n-3	4.6±0.4b	2.7±0.3a	1.9±0.2a	4.1±0.3c	3.3±0.2b	2.3±0.3a
22 : 5n-3	2.0±0.2b	0.6±0.0a	0.3±0.0a	2.0±0.2b	1.2±0.2a	1.1±0.1a
22 : 6n-3	11.2±0.4b	5.7±0.2a	4.5±0.3a	4.1±0.4b	1.6±0.2a	1.3±0.1a
Total n-3	28.9±0.4b	26.4±0.3b	15.2±0.3a	19.4±0.4b	20±0.4b	15.8±0.4a
n-3/n-6	1.7±0.2c	1.1±0.1b	0.5±0.0a	1.0±0.1c	0.8±0.0b	0.5±0.0a
Total PUFA	45.6±0.6a	50.0±0.5b	43.8±0.4a	39.2±0.8a	45.3±0.7b	49.9±0.4b

注:含量较少的脂肪酸(如 C20 : 0、C22 : 0、C22 : 4n-6)未列入表中;SFA:饱和脂肪酸,MUFA:单不饱和脂肪酸,PUFA:多不饱和脂肪酸。表中数据为 3 个平行的平均值。同行数据标不同字母表示差异显著($P<0.05$)。Note:Some fatty acids,of which the contents are minor,trace amount or not detected (such as C20 : 0,C22 : 0,C22 : 4n-6) were not listed in the table; SFA:Saturated fatty acid,MUFA:Mm-
onounsaturated fatty acid,PUHA:Polyunsaturated fatty acids. Values represent mean±SD of three replicates. Values with different letter in the same line differ significantly ($P<0.05$).

通过 RT-PCR 测定泥鳅肝组织调控 PUFA 合 量上升但并不显著。相比其他组,CO 组泥鳅
成相关基因的表达。结果表明,相比 FO 组,其他组 *srebpl-1c* 和 *scd* 基因表达量显著增加($P<0.05$),但
elovl2 表达量显著上升($P<0.05$)。相比其他组,不同组之间 *ppar-γ* 基因表达量没有显著差异
CO 组 *elovl5* 表达显著增加($P<0.05$),SO 组表达 (图 6)。



误差棒上方不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$). Different letters above the error bars indicate significant differences ($P < 0.05$).

图6 不同试验组泥鳅肝组织基因表达量

Fig.6 Gene expression of loach liver in different experimental groups

3 讨论

本研究利用 RACE 技术,证实了泥鳅 ELOVL2、ELOVL5 和其他物种非常相似,都具有脂肪酸延长酶家族典型的结构特征。泥鳅 ELOVL2、ELOVL5 氨基酸序列 C 端均含有内质网滞留信号(ER),该结构是延长酶家族典型的保守结构^[30]。在系统发育树中,我们发现泥鳅和斑马鱼 ELOVL2 和 ELOVL5 有较高的同源性,ELOVL2 和 ELOVL5 彼此之间的相关性较低,与斑马鱼相似,泥鳅 ELOVL2 和 ELOVL5 没有亚型^[13]。利用 RT-PCR 技术检测到 *elovl2* 和 *elovl5* 在泥鳅不同组织中都有表达,在肝脏和脑组织中转录水平较高,表明 *elovl2* 和 *elovl5* 参与了泥鳅肝和脑组织中 LC-PUFA 合成。*elovl5* 在性腺中高表达表明 LC-PUFA 对鱼的繁殖能力和早期生存起着重要影响^[13]。*elovl2* 和 *elovl5* 在眼睛中并未高表达,可能 *elovl4* 也是眼睛中 LC-PUFA 合成的关键基因之一^[31]。

已有研究表明,虹鳟 ELOVL5 只对 C18-20 PUFA 底物有延长作用,而不是 C22 PUFA,相反 ELOVL2 对 C20-22 PUFA 底物有活性而不是 C18 PUFA^[14],这与我们的研究结果相似。在本研究中泥鳅 ELOVL2 可以延长 C18 脂肪酸底物,但转化率较低,这结果与斑马鱼相似^[13],此外,有报道在大西洋鲑和线鳢 (*Channa striata*) 中发现 ELOVL2 具有延长 C22 的能力^[11,32],而泥鳅 ELOVL2 不能延长 C22 脂肪酸。在本研究中 ELOVL5 对 18:3n-6 有更强的活性,这可能是 PUFA 合成的主要途径。笔者所在研究室之前的研究中发现泥鳅 ELOVL4a 和 ELOVL4b 也具有延伸 18C 脂肪酸的能力^[22],同时 ELOVL4 可以延伸 C20 以上的 LC-PUFAs^[31]。因此,在鱼体中,ELOVL2、ELOVL4 和 ELOVL5 都有着延伸 LC-PUFA 的能

力,他们之间的关系值得后续研究。

本研究通过投喂 3 种不同脂肪源的饲料发现,与 FO 组相比较,肝脏 n-3 PUFA 含量没有显著性差异,表明了饲料 CO 添加可增加鱼体总 n-3 PUFA 含量。同时相比 SO 组,CO 组泥鳅 20:4n-3 含量显著上升,尽管 EPA 和 DHA 含量也出现升高但没有显著性差异。对大黄鱼的研究结果表明,亚麻籽油和豆油替代鱼油降低了肝脏和肌肉中 LC-PUFA 的含量,亚麻油并没有增加 n-3 PUFA 的累积^[33]。这可能是因为大黄鱼作为海水鱼自身合成 LC-PUFA 能力不足,而泥鳅为淡水杂食鱼具有合成 LC-PUFA 的能力。在泥鳅肌肉组织中,CO 组 EPA 含量显著高于 SO 组,而 DHA 含量没有显著差异,这可能是因为投喂周期过短,泥鳅合成 DHA 的积累需要一定时间。*srebp-1c* 和 *scd* 是脂肪酸合成的关键调控基因,本试验结果显示 CO 组泥鳅肝脏 *elovl2*、*elovl5*、*srebp-1c* 和 *scd* 表达量显著高于 FO 组,这表明饲料 CO 添加,促进了泥鳅 PUFA 自身合成能力。

综上所述,本研究克隆获得了泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 基因,验证泥鳅 ELOVL2 和 ELOVL5 在 LC-PUFA 合成中起到重要作用。CO 可作为饲料脂肪源,改善泥鳅肉质中 n-3LC-PUFA 含量。

参考文献 References

- [1] 宋芸,丁华,吴葆杰.n-3 多不饱和脂肪酸的研究进展[J].中国海洋药物杂志,2005,24(6):57-60. SONG Y, DING H, WU B J. Research progress of n-3 polyunsaturated fatty acids[J]. Chinese marine animals, 2005, 24(6): 57-60 (in Chinese).
- [2] SANDALIO L M, DALURZO H C, GOMEZ M, et al. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants[J]. Journal of experimental botany, 2001, 52(364): 2115-2126.
- [3] 夏延平,苏宜香.n-3 多不饱和脂肪酸影响炎症及免疫分子机制研究进展[J].现代免疫学,2004,24(6):517-519. XIA Y P, SU Y X. Research progress of n-3 polyunsaturated fatty acids affect inflammation and immune molecular mechanism[J]. Modern immunology, 2004, 24(6): 517-519 (in Chinese).
- [4] SALEM N, LITMAN B, KIM H Y, et al. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system [J]. Lipids, 2001, 36(9): 945-959.
- [5] 李明珠,马洪明.海水鱼类必需脂肪酸的合成能力[J].中国海洋大学学报,2010,40(s1):59-64. LI M Z, MA H M. Capability for synthesizing essential fatty acids in marine fish: a review [J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(s1): 59-64 (in Chinese with English abstract).
- [6] OHNO Y, HOLTHUIS J. ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis [J]. Proceedings

- of the national academy of sciences of the united states of america, 2010, 107(43):18439-18444.
- [7] JAKOBSSON A, WESTERNBERG R. Fatty acid elongases in mammals; their regulation and roles in metabolism [J]. Progress in lipid research, 2006, 45(3):237-249.
 - [8] TAMURA K, MAKINO A, HULLIN-MATSUDA F, et al. Novel lipogenic enzyme ELOVL7 is involved in prostate cancer growth through saturated long-chain fatty acid metabolism [J]. Cancer research, 2009, 69(20):8133-8140.
 - [9] OFMAN R, DIJKSTRA I M E, ROERMUND C W T, et al. The role of ELOVL1 in very long-chain fatty acid homeostasis and X-linked adrenoleukodystrophy [J]. EMBO molecular medicine, 2010, 2(3):90-97.
 - [10] HARKEWICZ R, DU H, TONG Z, et al. Essential role of ELOVL4 protein in very long chain fatty acid synthesis and retinal function [J]. Journal of biological chemistry, 2012, 287(14):11469-11480.
 - [11] MORAIS S, MONROIG O, ZHENG X, et al. Highly unsaturated fatty acid synthesis in *Atlantic salmon*; characterization of elovl5-like and elovl2-like elongases [J]. Marine biotechnology, 2009, 11(5):627-639.
 - [12] 魏帮鸿, 杨志刚, 施秋燕, 等. 水生动物脂肪酸延长酶基因研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(10):247-253. WEI B H, YANG Z G, SHI Q Y, et al. Overview of fatty acid elongase genes in aquatic animals[J]. Genomics and applied biology, 2017, 36(10):247-253(in Chinese with English abstract).
 - [13] MONROIG O, ROTLLANT J, SANCHEZ E, et al. Expression of long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) biosynthesis genes during zebrafish (*Danio rerio*) early embryogenesis [J]. Biochim biophys acta, 2009, 1791(11):1093-1101.
 - [14] GREGORY M K, JAMES M J. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ELOVL5 and ELOVL2 differ in selectivity for elongation of omega-3 docosapentaenoic acid [J]. Biochimica et biophysica acta, 2014, 1841(12):1656-1660.
 - [15] 谢帝芝, 王树启, 游翠红, 等. 鱼类高度不饱和脂肪酸合成的影响因素及其机理[J]. 中国水产科学, 2013, 20(2):456-466. XIE D Z, WANG S Q, YOU C H, et al. Influencing factors and mechanisms on HUFA biosynthesis in teleosts[J]. Journal of fishery sciences of China, 2013, 20(2):456-466(in Chinese with English abstract).
 - [16] 谢帝芝, 陈芳, 张庆昊, 等. 鱼类 LC-PUFA 合成代谢调控机制研究进展[J]. 汕头大学学报, 2015, 30(2):3-19. XIE D Z, CHEN F, ZHANG Q H, et al. Advance in the regulatory mechanisms of LC-PUFA biosynthetic metabolism of teleost[J]. Journal of Shantou University(Natural science edition), 2015, 30(2):3-19(in Chinese with English abstract).
 - [17] USHER S, HAN L, HASLAM R P, et al. Tailoring seed oil composition in the real world: optimising omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid accumulation in transgenic *Camelina sativa* [J]. Scientific reports, 2017, 7(1):6570-6584.
 - [18] BETANCOR M B, LI K, SPRAGUE M, et al. An oil containing EPA and DHA from transgenic camelina sativa to replace marine fish oil in feeds for atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effects on intestinal transcriptome, histology, tissue fatty acid profiles and plasma biochemistry [J]. PLoS One, 2017, 12(4):e0175415[2019-04-02]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175415>.
 - [19] MOCK T S, FRANCIS D S, JAGO M K, et al. Altered levels of shorter vs long-chain omega-3 fatty acids in commercial diets for market-sized (*Atlantic salmon*) reared in seawater-effects on fatty acid composition, metabolism and product quality [J]. Aquaculture, 2019, 499(1/2):167-177.
 - [20] 宋晓然, 詹凡玢, 王卫民. 泥鳅二倍体与四倍体 trim63a 基因的克隆及表达分析[J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(5):17-25. SONG X R, ZHAN F B, WANG W M. Cloning and Expression Analysis of *trim63a* in diploid and tetraploid *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Journal of Agricultural University, 2019, 38(5):94-103(in Chinese with English abstract).
 - [21] 张义凤, 王丽伟, 曹小娟, 等. 泥鳅 elovl1 基因克隆、表达分析及其在低温胁迫下的响应[J]. 华中农业大学学报, 2018, 37(4):102-111. ZHANG Y F, WANG L W, CAO X J, et al. Cloning and characteristic analysis of elovl1 genes from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) and its role in adaptation to cold temperature [J]. Journal of Agricultural University, 2018, 37(4):102-111(in Chinese with English abstract).
 - [22] CHEN J, CUI Y, YAN J, et al. Molecular characterization of elongase of very long-chain fatty acids 6 (*elovl6*) genes in *Misgurnus anguillicaudatus* and their potential roles in adaptation to cold temperature [J]. Gene, 2018, 666(5):134-144.
 - [23] YAN J, LIANG X, CUI Y, et al. ELOVL4 can effectively elongate C18 polyunsaturated fatty acids in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. Biochemical & biophysical research communications, 2017, 495(4):2637-2642.
 - [24] LIANG X, ZHAO Y T, LI Y, et al. Identification and structural characterization of two peroxisome proliferator activated receptors and their transcriptional changes at different developmental stages and after feeding with different fatty acids [J]. Comparative biochemistry & physiology part B biochemistry & molecular biology, 2016, 193(7):9-16.
 - [25] ZHANG Y, LI Y, LIANG X, et al. Hepatic transcriptome analysis and identification of differentially expressed genes response to dietary oxidized fish oil in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. PLoS One, 2017, 12(2):e0172386[2019-04-02]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0172386>.
 - [26] LIANG X, GAO J, LI Y, et al. Cloning and expressions of peroxisome proliferator activated receptor alpha1 and alpha2 (*PPARα1* and *PPARα2*) in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) and in response to different dietary fatty acids [J]. Biochem biophys res commun, 2016, 481(1):38-45.
 - [27] 高坚, 李洋, 叶伟钊, 等. 不同脂肪源对泥鳅稚鱼生长性能及脂肪酸组成的影响[J]. 水生生物学报, 2016, 40(1):1-9. GAO J, LI Y, YE W Z, et al. The growth performances and the fatty acid compositions of dojoloach *Misgurnus anguillicaudatus* fry fed with different lipid sources[J]. Acta hydrobiologica sinica, 2016, 40(1):1-9(in Chinese with English abstract).

- [28] GAO J, KOSHIO S, ISHIKAWA M, et al. Effects of dietary oxidized fish oil with vitamin E supplementation on growth performance and reduction of lipidperoxidation in tissues and blood of red sea bream *pagrus major* [J]. *Aquaculture*, 2012, 356/357(4): 73-79.
- [29] LI Y, LIANG X, YIN Z, et al. Effects of different dietary soybean oil levels on growth, lipid deposition, tissues fatty acid composition and hepatic lipid metabolism related gene expressions in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) juvenile [J]. *Aquaculture*, 2016, 451(7): 16-23.
- [30] AGABA M, TOCHER D R, ZHENG X, et al. Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases of marine and freshwater teleost fish [J]. *Comp biochem physiol B biochemistry & molecular biology*, 2005, 142(3): 350-352.
- [31] MONROIG O, ROTLLANT J, CERDA-REVERTER J M, et al. Expression and role of *elovl4* elongases in biosynthesis of very long-chain fatty acids during zebrafish (*Danio rerio*) early embryonic development [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2010, 1801(10): 1145-1154.
- [32] KUAH M K, JAYA-RAM A, SHU-CHIEN A C. The capacity for long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a carnivorous vertebrate: functional characterisation and nutritional regulation of a *fads2* fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity and an *elovl5* elongase in striped snakehead (*Channa striata*) [J]. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular and cell biology of lipids*, 2015, 1851(3): 248-260.
- [33] 李经奇, 李学山, 姬仁磊, 等. 亚麻籽油和豆油替代鱼油对大黄鱼肝脏和肌肉脂肪酸组成及 $\Delta 6fad$ 基因表达的影响 [J]. *水生生物学报*, 2018, 42(2): 232-239. LI J Q, LI X S, JI R L, et al. The effects of linseed oil and soybean oil on fatty acid composition and $\delta 6fad$ gene expression in liver and muscle of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *Acta hydrobiologica sinica*, 2018, 42(2): 232-239 (in Chinese with English abstract).

Cloning, expression analysis and functional study of loach (*Misgurnus anguaudatus*) *elovl2* and *elovl5* genes and their effects on the synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA)

LI Xin, GAO Jian

*College of Fisheries/Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics Breeding
and Reproduction, Ministry of Education/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract To investigate roles of the long-chain fatty acid elongase 2 and 5 (*elovl2*, *elovl5*) genes played in biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) in loach (*Misgurnus anguaudatus*), full-length cDNA sequences of the loach *elovl2* and *elovl5* were cloned and their expression patterns in different tissues were analyzed in this study. Functional characterizations of the loach *elovl2* and *elovl5* in synthesis of fatty acids were studied by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro*. Loach were fed with three experimental diets containing fish oil (FO), camelina oil (CO) and soybean oil (SO), respectively, for 8 weeks to evaluate the effects of different dietary lipid sources on expressions of the loach *elovl2* and *elovl5*. The results showed that the open reading frame (ORF) of the loach *elovl2* and *elovl5* was 888 bp and 876 bp, encoding 295 and 291 amino acids, respectively. Phylogenetic analysis showed that they clustered closely with the zebrafish *elovl2* and *elovl5* and sequence comparison showed that they were highly conserved in vertebrates, containing the special structure of long-chain fatty acid elongases. The expression levels of *elovl2* and *elovl5* were highest in the liver. *ELOVL2* elongated C20-22 PUFA, while *ELOVL5* was able to elongate C18-20 PUFA, having no effect on C22 PUFA. The content of n-3 PUFA in the liver and muscle and 20 : 5 n-3 in the muscle increased significantly, while 22 : 6 n-3 in the liver and muscle did not increase significantly in the CO group. In addition, expressions of the loach *elovl2*, *elovl5*, *scd* and *srebp-1c* in the liver were significantly increased. In conclusion, *elovl2* and *elovl5* played an important role in regulating the synthesis of LC-PUFA and CO used in diet could promote the accumulation of n-3 PUFA in loach.

Keywords *Misgurnus anguaudatus*; long-chain polyunsaturated fatty acids; elongase of long-chain fatty acid 2; elongase of long-chain fatty acid 5; lipid source

(责任编辑:边书京)