

魏君冉, 梁旭方, 徐晶, 等. 鳊不同亚型瘦素受体基因克隆与表达分析[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(4): 157-165.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.04.019

鳊不同亚型瘦素受体基因克隆与表达分析

魏君冉, 梁旭方, 徐晶, 蔡文静

华中农业大学水产学院/华中农业大学鳊鱼研究中心/农业农村部淡水生物繁育重点实验室/
湖北省名优鱼育种与健康养殖工程技术研究中心, 武汉 430070

摘要 以鳊(*Siniperca chuatsi*)为研究对象, 使用 cDNA 3'末端快速克隆法扩增瘦素受体基因(*lepr*)cDNA 序列, 获得了由 mRNA 3'端可变剪切产生的鳊 *lepr* 的 4 个不同亚型, 包括编码序列(coding sequence, CDS)长度为 3 474 bp、编码 1 157 个氨基酸的长型受体亚型 *lepr-L*, 以及 3 个短型受体亚型 *lepr-S1*、*lepr-S2* 和 *lepr-S3*, CDS 长度分别为 1 512、945 和 915 bp, 分别编码 503、314、304 个氨基酸。对氨基酸序列进行结构域分析和多重比对发现, 鳊 *lepr* 长型受体亚型包含完整的功能域, 短型受体亚型无跨膜区及胞内结构, 鳊 *lepr* 及其 leptin 结合域(leptin binding domain, LBD)序列保守程度高。鳊 *lepr* 在鳃中表达最高, 其次是肾和垂体, 腹腔注射鳊 leptin B 而非 leptin A 的同源重组蛋白 2 h 后引起脑 *lepr* 表达量的升高($P < 0.05$)。以上结果表明, 鳊 leptins 能引起组织中 *lepr* 表达的不同变化而发挥独特的生理功能。

关键词 鳊; 瘦素受体; RACE; 基因克隆; 基因功能; 摄食调控; 受体亚型; 饱食因子

中图分类号 S 917.4; Q 959.483 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)04-0157-09

瘦素(leptin)在 1994 年首次在小鼠(*Mus musculus*)中被发现, 并描述为一种由肥胖基因(obese gene, *ob*)编码的、由脂肪细胞分泌的多肽激素^[1]。在哺乳动物中, leptin 由脂肪组织合成并分泌进入血液, 通过血脑屏障后到达下丘脑并与瘦素受体(leptin receptor, *lepR*)结合, 导致食欲降低和脂质代谢增加^[2]。继 leptin 被发现后, Tartaglia 等^[3]随即在小鼠中克隆出 *lepR* 基因。已有的研究表明, 哺乳动物只有一个 *lepR* 基因的旁系同源物, *lepR* mRNA 通过 3'端的可变剪切形成 6 种不同的亚型, 这 6 种不同的亚型可分为长型(*lepRb*)、短型(*LepRa*、*LepRc*、*LepRd*、*LepRf*)、分泌型(*lepRe*)3 类^[4]。自首次发现小鼠的 *lepR* 基因十多年后^[3], Wong 等^[5]首次在海洋青鲈(*Oryzias melastigma*)中发现鱼类的 *lepr* 基因。不同于哺乳动物的是, 在大多数鱼类中只克隆出长型 *lepr*, 如日本青鲈(*Oryzias latipes*)^[6]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[7]和斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[8]等。在少数鱼类中通过 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplifi-

cation of cDNA, RACE)克隆出多个由 *lepr* mRNA 3'端可变剪切产生的受体亚型, 如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[9], 黑鲫(*Carassius carassius*)^[10]和欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[11]。

鱼类长型受体具备哺乳动物 *lepR* 高度保守的结构, 短型受体亚型的胞内结构、氨基酸组成及序列长度均存在差异, 分泌型受体通常缺乏胞内区和跨膜区。与哺乳动物一致, 鱼类的 *lepr* 只有长型受体亚型具备完全的重要功能域。在虹鳟^[9]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[12]及黑鲫^[10]中的研究发现短型受体亚型可能与能量稳态有关。对于鱼类可溶性 leptin 受体的研究发现其与 leptin-a 的结合能力高于 leptin-b, 随着对多种鱼类的 *lepr* 基因的鉴定和研究的深入, 发现 *lepr* 及其 leptin 结合域(leptin binding domain, LBD)在鱼类进化过程中相对保守^[7-8, 11, 13]。

在哺乳动物及鱼类中, leptin 通过其专一性受体结合传导抑食欲信号^[14-15]。使用哺乳动物同源重组的 leptin 蛋白处理金鱼可导致其摄食量下降^[16], 与在哺乳动物中观察到的结果一致, 但类似的处理

收稿日期: 2020-12-14

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-46); 国家重点研发计划项目(2018YFD0900400)

魏君冉, E-mail: weijunran@qq.com

通信作者: 梁旭方, E-mail: xufang_liang@hotmail.com

并不能影响银大马哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*)^[17]、鲢 (*Silurus asotus*)^[18] 和绿海鲂 (*Lepomis cyanellus*)^[19] 的摄食行为。这些不同的结果可能是鱼类和哺乳动物的 leptin 及 lepr 氨基酸序列差异较大引起的。因此,研究鱼类 leptin 及 lepr 的结构和功能对于研究鱼类摄食行为来说至关重要。鳊是我国特有的名贵淡水鱼,其食性奇特,自开口起终身以活饵为食,但经长期驯化才可食人工饲料。本课题组在前期研究氨基酸、脑肠肽 (PYY) 对鳊摄食调控等^[20-21] 工作的基础上,利用 3' RACE 技术,克隆鳊由 mRNA 的 3' 端可变剪切 4 个不同的 *lepr* 受体亚型,检测长型受体亚型在鳊组织中的表达情况,以及注射鳊同源重组 leptin 蛋白对其在脑中表达的影响,以期为后续深入研究鳊不同亚型的 *lepr* 在摄食调控、生理代谢中的功能及 *leptin-a* 和 *leptin-b* 的基因功能提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验鱼及饲养条件

试验鱼来自华中农业大学鳊鱼研究中心,于农业农村部鳊鱼育种创新基地的循环水养殖系统中暂养 14 d,水温为 (25±1) °C, pH 为 7.53~7.70,氨氮、亚硝酸氮、硝酸氮质量浓度均低于 0.1 mg/L,每天 09:00 和 17:00 各饱食投喂鲜活麦鲢 (*Cirrhinus mrigala*) 1 次。

1.2 鳊 leptin A 和 leptin B 同源重组蛋白的表达、纯化及腹腔注射

鳊 leptin A 和 leptin B 同源重组蛋白的表达和纯化方法参照 Yuan 等^[22] 的方法进行。暂养结束后,随机选取 9 尾健康、体表无伤、质量为 (230±16) g 的鳊,饥饿 24 h 后,使用 MS-222 麻醉后称取质量。采用腹腔注射的方法,试验组注射

1 000 ng/g 的溶解于 DPBS 的 leptin A 或 leptin B 同源重组蛋白,对照组注射等量的 DPBS 溶液,每组注射 12 尾试验鱼。

1.3 组织的获取及 RNA 的提取

取样前,手术刀、手术剪及 1.5 mL 离心管均于 37 °C 下质量分数为 0.1% 的焦碳酸乙二酯 (DEPC) 浸泡 12 h,随后使用高压灭菌锅于 120 °C 下处理 30 min 以去除 DEPC,烘干后密封保存备用。鳊经 MS-222 麻醉后,解剖提取 3 尾试验鱼的垂体组织,所获得的垂体组织置于 1.5 mL 离心管并立即冻存于液氮中,取样结束后冻存于 -80 °C,用于后续 *lepr* 的 3'-RACE 克隆。取 6 尾试验鱼的端脑、中脑、小脑、垂体、下丘脑、延脑、肝脏、肠、肾、脂肪组织、鳃、脾和心组织置于 1.5 mL 离心管并立即冻存于液氮中,用于后续检测 *lepr* 基因的组织表达。分别在注射鳊 leptins 同源重组蛋白 2 h 及 4 h 后取每组鳊的脑组织,置于 1.5 mL 离心管并立即冻存于液氮中。

将用于 *lepr* 的 3'-RACE 克隆的垂体组织混合,其余组织取适量放入干净的 1.5 mL 离心管中,向装有组织的离心管中加入 1 mL TRIzol 试剂,并装载入 -20 °C 预冷的组织破碎仪夹板中,充分匀浆后按照有机溶剂抽提 RNA 法提取组织 RNA。RNA 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性后用于后续试验。

1.4 3' RACE 引物设计及 *lepr* cDNA 全长克隆

从鳊基因组数据库中调取 *lepr* 基因序列,根据 TaKaRa 公司的 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase 试剂盒的说明和 *lepr* 基因的核心序列设计外引物 Lepr-Outer,以及内引物 Lepr-Inner,用于扩增 *lepr* 的 cDNA 全长序列。用于 3' RACE 克隆的引物如表 1 所示。

表 1 本研究中所使用的克隆及定量引物

Table 1 Primers used for clone and qRT-PCR in this study

引物名称 Primer	引物序列 (5'-3') 5'-3' sequence	退火温度/°C Annealing temperature	用途 Usage
Lepr-Outer	TACTCCTCCAACACCACTCATCCAG	60	克隆 Clone
Lepr-Inner	AGTGTGGAGCGACTGGAGTGAACCT	65	克隆 Clone
RT-SC-rpl13a-F	CACCTATGACAAGAGGAAGC	58	qRT-PCR
RT-SC-rpl13a-R	TGTGCCAGACGCCAAG		qRT-PCR
RT-SC-lepr-L-F	TTCCAAAGTCGTCATAGAGG	59	qRT-PCR
RT-SC-lepr-L-R	TATTCTTGGGCTTGAACCTGG		qRT-PCR

使用 TaKaRa 公司的 3'-Full RACE Core Setver2.0 以及 DNA 聚合酶(TaKaRa, 日本)合成鳊 *lepr* 基因 cDNA 全长序列。根据试剂盒的使用说明操作, 获得 PCR 产物, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测无误后用于连接、转化。

1.5 *lepr* 基因 3' RACE 克隆产物的连接、转化及测序

PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶并使用 Omega 公司的 EZNA Gel Extraction Kit 试剂盒进行纯化回收, 并接入 T 克隆载体(北京全式金公司, pEASY ©-T1 Cloning Kit)。将克隆载体转入 DH5 α 感受态细胞(北京全式金公司), 用不含氨苄的 LB 培养液在 37 °C 的摇床中培育 1 h 后, 吸取 200 μ L 菌液涂于含有氨苄的 LB 固体培养基平板上, 37 °C 过夜培养。挑选阳性克隆送武汉生工生物工程有限公司测序。

1.6 不同亚型的 *lepr* 基因的生物信息学分析

使用 NCBI 网站的 BLAST 及 ORF finder 工具将测序结果与鳊基因组调取的 *lepr* 序列进行比对, 并预测其氨基酸序列。分别使用在线软件 Signal P 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), TMPred Server (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html) 及 SMART: Main page (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测测序所得的 *lepr* 序列的信号肽、跨膜区和结构域。从 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 获取以下 15 个物种的 *lepr* 氨基酸序列: 人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、爪蟾(*Xenopus tropicalis*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、尖吻鲈(*Lates calcarifer*)、欧洲鲈、罗非鱼(*Dreochromis niloticus*)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、虹鳟、大西洋鲑、日本青鳉、斑马鱼、黑鲫, 利用 Bioedit 软件对上述氨基酸序列进行多重比对, 并使用 MEGA 6.0 软件构建上述物种 *lepr* 蛋白质的系统进化树(bootstrap=1 000)。

1.7 qRT-PCR

通过 qRT-PCR 技术检测 DNA 的表达水平。20 μ L 反应体系: ChamQ SYBR qPCR Master Mix(诺唯赞, 南京) 10 μ L, F/R 引物 0.4 μ L, 模板 cDNA 1 μ L, 双蒸水 8.2 μ L。qRT-PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 15 s, 引物特异性退火温度下 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 40 个循环。溶解曲线以 0.5 °C/s 的

速度从 95 °C 降低至 65 °C, 每 6 s 采集 1 次信号。

2 结果与分析

2.1 *lepr* cDNA 3' RACE 克隆

使用 3' RACE 技术克隆获得 *lepr* cDNA, 发现 4 个不同大小的 DNA 片段。经测序发现这 4 个 DNA 片段均为 *lepr* mRNA 经 3' 可变剪切产生的不同亚型, 长度分别为 3 474、1 512、945 和 915 bp。

2.2 *lepr* 基因与氨基酸序列分析

将使用 3' RACE 技术克隆得到的 4 条序列与从鳊基因组中获取的 *lepr* 序列进行比对分析, 发现 1 个长型受体亚型 *lepr-L*, 3 个由 mRNA 3' 端可变剪切产生的短型受体亚型: *lepr-S1*、*lepr-S2*、*lepr-S3* (图 1)。*lepr-L* 的 CDS 长度为 3 474 bp, 编码 1 157 个氨基酸; 短型受体亚型 *lepr-S1*、*lepr-S2* 和 *lepr-S3* 的 CDS 长度分别为 1 512、945 和 915 bp, 分别编码 503、314 和 304 个氨基酸。序列分析发现, 鳊 *lepr-L* 蛋白具有 1 个信号肽结构、1 个跨膜区、1 个免疫球蛋白(Ig) C2-like 结构域、1 个 LBD 结构域, 2 个 FNIII 结构域和 2 个重复的色氨酸/丝氨酸基序(WXWS), 含有 JAK 和 STAT 功能域等全部胞内结构。除 *lepr-S1* 蛋白具备不完整的 LBD 结构域外, 其余 2 个短型受体亚型均不具备 LBD 结构域, 同时, 所有短型受体亚型均丢失跨膜区和所有胞内结构域(图 2)。如表 2 所示, 鳊 *lepr-L* 的氨基酸序列与鱼类同源性高(42%~86%), 与哺乳动物同源性低(26%~28%)。

2.3 *lepr* 氨基酸序列多重比对和进化树分析

鳊 *lepr-L* 亚型的 LBD 序列与其他物种氨基酸序列多重比对发现, 鳊与石斑鱼、罗非鱼和欧洲鲈同源性最高(75%~87%), 其次是虹鳟和大西洋鲑(48%), 与斑马鱼、黑鲫、小鼠和人同源性最低(31%~42%)(图 3)。

比对 16 个不同物种的 *lepr* 氨基酸序列并构建系统进化树。如图 4 所示, *lepr* 进化树整体分为 2 支, 哺乳动物和两栖动物的 *lepr* 聚为一支, 鱼类的 *lepr* 聚为另一支。鳊与鲈形目鱼类的 *lepr* 的亲缘关系最近, 其次为鲑鳟类, 与鲤科鱼类的亲缘关系最远。

2.4 *lepr* 在鳊各组织中的表达情况

图 5 所示为 *lepr-L* 在鳊各组织器官中的表达情况。在鳊中, *lepr-L* 在鳃中表达量最高, 其次是肾、垂体、肠、脾、脂肪组织、心、肝、中脑、下丘脑和小脑, 在小脑和端脑中表达量最低。

lepr-L

CGGGAAAGTACGCTGGTTACGTCGAATGAAACAGCAGCGCGGTGAGAAAGGAAAGCGCTGGCGGTTGTTGGGAATCAGACTCAACAGTGGACAGTGAACCTGACGAGGCGCAGACAT 130
 CTGACCGGAGCACTAACTCACTGACTGAACCTCGAGAAAGGAACTGGACAAAGAAAGCAAGCAAGTTCAGAGGATGAGATTCACCTCCAGCAAAGCGCTAGGCTAGCTCAGCA 260
 ATGACCACTCAATGTTCCGGCTGATGTGACAGCTGATGATATTTCCCTGGTCCCACTGGCTCAGATGTTTGGAGCCGGAGGAGGAGCTCATCATTCAGATGGCCCTG 380
M T T T M V R A V M L T V L M H I S L V P H G A Q C L E P E E G A S I Y D A L L 480

Signal peptide
 GACGTCCTCCATGATGAGCTGTGCTGACTCACCTTCAACCTCACTACTGCGGAGGGAGATGAGAAGCTTGCACGGAGACAAACCGCTCTGAATCAACCTCCCACTATTAT 500
 D V P W H D E L C C D S P S T H L T A E G D E K L A P E T N R S E S N L P H Y Y 80

CGCTGCAACTCAGGAGCTTGAACCAAACTCATCTCATGAGCCTTCCCGCACCTGTTTGACATACTGTGAGAATGATGAAAATGGGAAAATTTAATCTGTGACCTTCA 620
 R C N F R S L T T K S H P H E P S A G T C L D I L C R I D E N W E N L T C D L Q 120

TTTCCGGTCCACCTCAACACCGCTGAATGCTGGTCTATGCTATTAGCTTACACGCTCTATTGCCAGAAAGGAGACACAGAGGTGAACATGGGAATCTGCTATGCAACTCT 740
 F H G P P S T T L N A G L M A F S L Q R L L S Q K E D T E V N D G N P A S D N P 160

GTTTCTGGAAGCGGAGATCTTCCAGTGTTCAGTCCTTTCAGAGAAACAACCTTTTCCACTGTAACCTCAGCATCTCAACCGCTAGCTCCACCGCTCTCTCAGA 860
 V F C E A E D S F T C S V A L D R T T T F V T M V T L S I S N A V A P A V L L L R 200

ATTCCTGCCGACTGAAACCAAGTCTCCAGTCAACTGTACACATCAGACACTTGAAGGACAGAACTGATTTTACACTGGGACGACCTCAGACTCTGATATTGGTCGCTGAGA 980
 I P A R Y K P S P P V N L S H I Q T I E A E L I L H W D D P S D S D I G C P L R 240

Fibronectin type 3 domain
 TACGAGGTCGATACTCCCAACCACTCCTCCAGCTGGCGAGGCTGTCACCTGTCGATCTGAAACCCAGACTGAACCTACACCTCCAGGTTCCG 1100
 Y E V R Y S S N T T H P A W Q V V S A P G E P R S S L D L K P R L N Y T I Q V A 280

Lepr-S3>1
TGCTCAGCTGGCAAGCTCCAGTGTGGAGCAGCTGAGTGAACCTCACCACCTACTGGACAGCGTGAAGTACCTCCGAAAGTGGTGGCGGACAGGAGGAAAGTAAAGTGTGTGTG 1220
C L J D A M D C S W K N T Q W T E P K F R S R W A D L P C D V M E E R B E R A G K 320

Ig-like C2-type domain
 TCAACGCACCAACATCACTCCAGCAGCGCCATGTGGATGCTCAACTCGAACAGCGGCTTCTCGCAGCAGTACCACCCAGTCAACCAATGGTCCAGCCAGATC 1340
 Y V C Y F N D H N I N S T A M W M L N F E Q R L H R S Q Y H P V N Q W V S I 360

Lep binding domain
 ACAGTGCCTCTCAGAGACTCGGATGATGACTCTGCGAGTCACTCAGGAGTGGACCACTCCATACAGCAGATCTATGTAGAAGGAGCTTATGATAAACTGTGAAACCA 1460
 T V R P S E T R M Y D L L Q C T Q E W T I P Y S Q I Y V E G A S L D L N C F T N 400

Lepr-S2>1
 GGTTGATCGACCTATGACTGACTGGAAGACACACAGTGGACTGAAACAATCAGATCAGTGGTGGCTGACTGCTGATGATGATGGAGGAGGAGGAGAGAGGGGATG 1580
 G D J D A M D C S W K N T Q W T E P K F R S R W A D L P C D V M E E R B E R A G K 440

AACGTGGGGAGTGGGCCCTGCTGCTCGAGTCCGATCAGGACCAAGACTGCCATCCAGCTCTGAGGATGAAGCTGCTCAAGCTGTGGCTGGAATGACATCCGACTGGCC 1700
 N V G E M G P A C L R V S R H K T E C I I Q P L R M M C Y K L W L E V P S R L G 480

Lepr-S1>1
 CCAATGAGTCAACCACTACTGCTGCTCAGATGATGTAACCCACACCAACCAACAGTGAAGGCAAGTGAAGGCAAGTGGGGTCTGATGGTCAACCTCCAGGCTCCG 1820
 P L R S X P L Y L S P L D H V K P H T P T N V K A V S R S S G V L M V T W E P P 520

Fibronectin type 3 domain
 TCTCTCCAGTCCAGGGGCTCAGTTCGATGCTGCTATCACCTCCGCTGTGAGAGCCGAGCCGAGTGGAAAGTCCAGATCCAGTCCAGTCCGCGGCTCCAGGCGGAGGTGCA 1940
 S L P V F G L G C Q C R Y V S S P S A V R A Q P F W K V Q S P V R V P W A F V A 560
 GTCTCCGTCATGTCAGGCTGATGGTCAAGTCACTGATCAGCAACCAAGGCAAGCTACTGAGCAAAATGGGCAAACTCCGCTACTCCACCTCAACCAAGTCAAGAGCTCT 2060
V S V M C Q V V V Q V R C M H T N G T G V W S K W S K S V Y S J T P Q N S R A P 600

GAGCTGGCCCTGATTCGAGAACTTCGAGATGATCAATCAGAAACAGACTAATGCACTCTGCTATTGAGAACTCCAAATCAGGCACTCATCTGTGATGGATTT 2180
 E R G P D F W R I L Q D D P Y R N Q T N V T L L F E N L Q I S G H S Y C V D G F 640

ATAGTCCAGCAGCCGCTCGAGTGGCTGTGATGAGGAGCAGACTGAGCTGCTCTCCTTACAGCTTTGAGTGGACCAACTCTCCAACTGTGACTGAGGAGGCTACAATAG 2300
 I V Q H Q A A S S G L V M R E Q I E L V S S Y S F E W N Q L L Q T V T V E A Y N S 680

CTGGGAGTCCCACTAAACATCAACATGACACTGGAGAGCAGCCCAACGCCACTGTGCGTTCATTGAGTGTGGTATCAACAGCAGCTGTGCTGTCTGCTGAGCGCT 2420
 L G S T N I N M T L E R Q P K R H C V R S F S V L A I N S T C V R L V L A I N S T 720

TTGACCAACAGCTCCTACCTGCTCCTGAGTGGTGGTCTCCGAGAGCAAGCAGACTGTGATCATCCAGGCAAGTGGAGAAAATGGCCAGACTGGCTACTACCTGAC 2540
 L D N S S V P L S M V V Q W S P Q R Q Q D C D H H Q G Q S G E K W A R L P Y T D 760

CGTCCATCTATCAAGAGGTGATTTCTTGGCTCAGGAGTGGCTCTACTTGTGCTGTGTTGCTGATGGAGAGGGGAGCAGTGTACCTTTAGTTACAGCACTAGAGGA 2660
 R P I Y L R G D F F G S E E C G F Y L Y P V F A D G E G E P V Y A L V T A T R 800

GACCTTGCACTCAGTATGCTGATGACTCTCTCTCTCCTGCTGCTGCTCCCAACAGGATGAGAAAGTTGTTGGGAAAGTGTGCCAACCA 2780
D P A A Y M M L M I S F L S I V L F V T L V L S Q N Q M K K F V W K D V P N P 840

Transmembrane domain
 AACAGTGCCTCGGGCAAAGGACTAGACTCAAAAGGCTGACACTTGTACTCTGCTCCAGCCTCAGAAAGGCTCAGCCTGGCCACTGCTCTGCTCCAGAAATCTTC 2900
 N K C S W A K G L D F K K A D T T D Y L F R P P E G L S A W P L L L P S E N I S 880

JAK2 box1
 AAAGTCGTCATAGCGGCAAGGTTGATCTCGGCTGACTACAGTCAAGCCCACTGTGCTCCACTCCGCCCCAGCCACTGCTTATCTATCTCCCTCCAGGGTTGAC 3020
 K V V I A D K V D L S A L T T V Q A P L V S L T P A P A T A L S I S L P P G F D 920

JAK2 box2
 TCAAGGCTCGACCAAGCCCAAGTGTGAGAGTGGCTCTGATGAGTCCCTTCTTGTACTAATCTGATGATGATTTAACCAGTCAAGCCCAAGTACAGTGTGATTA 3140
 S E V D Q A Q P M E N E V L L D G A P S F V L N L D A L T S S S P R I D Q L L L 960

GTCGACCCCCAGCAGCAGCCCAAGCAGCAGCAGCTGCTGCCAGTCTCAGTCAACATACGCCACTGTGCTGCTCTGATCGAAGCAGGAGCAGCAGCCATCTCATCCAC 3260
 V D P P A D Q P P P G S T D S S A Q S V T Y A T V L L S D P K Q E Q Q P I H L H 1000

TACAAGGATGTAGTGGCAGCTCCAGCGATGAGGCAATTTCTGCGCAACACTCAGACATTTCTGGATCTTCCCGGCTGGCTGGGAGCTGGAGCTGGAGCCGCGGCTCTCG 3380
 Y K D G S G S S S D E G N F S A N S D I S G S F P G G L W E L D D P R S C 1040

TCTTACAATCTGTGAGGTTCTTCAACATCAGAGCAAGAGGAGGAGGAGTGAAGAAGAGGACTGTATTATAGGAATGACTGCTCCAGGATGACGAAAG 3500
 S Y N S V E V L S E T S E Q E D E E E V R E E K D L Y L G M D C P A E D E E S 1080

GAGGAAGCAGGAGGAGAGAGAGGAGCAAAAATGAGCTGCTAAAATGATGTTGAACAGAGGAGTGTCTGGCGTCGACCTTTGCTGGCCCTGAGGACTGTAGC 3620
 E E D E Q R E E T K I E L L K N V V L N R E D C S V A S H P L L G D L S 1120

AAGCTGCAGTCACTGCAATGCTGCTTCTCCGCTGACTGCTGCTGAGTGTAGAACCTGCAAGTGTGAGTCTTCCCGGCTGGCTGGAGCTGACTGCTGATGCTTGTGATCTCTGACTTTCT 3734
K L Q S A A M P D F S P L Y L P Q F R T A Q C T R Q L T A Q P Q E S T R P * 1152

STAT box

lepr-S1
TACCTGGAAAAAGAAACAATAAGTTACTTTTGATACAAGTCCCTGAGATTAACATCATGTATGGACTATGAGAGTCTATGGGTTTTTTGTCTCCCACTTAACAGGATGATGA 1841
 Y L E K G T T I S V T F D T S A * 503

GTTTGGCAAAGCGTTTGGATGATGCTGTTGCTGAGCAGTCACTTATGTTGGTTTTTGTGCAAGTCAAGTATTTGCTCAAACTGAGCTTAAATATGTAATACCACTTAAA 1961
 CTAGTGGGTAAAGTGGAGGATGATGATCGGAGACTCGGCTTCCAGCTGTTTTTGGACGCAACAAGGATTCACCACTCAGCTGTGATTAAGAGAACTAACTGTTCTGA 2081
 CTGAAAGTGGCAAGGTTCTGGACTGTACATGTCAATAAACAATAAGTCCAAATAATTCTGAAAAA

lepr-S2
CTGACAGTAATAACCACTTCCCTCAACTGTTACGAGGATACATACTAGAGTAATACTGAAGACAAAAAATGATTTTTTAATTAGTTTTTATCAACACTGGACCAAGCT 1280
 L D S N H F L S T V T R D T * 314

GGAAGGTTTTTGACGCTCTTTTTCCCTCTGTAATGTGATGTCACTCAGTACAACCTGCACTGTTTTTGGAAATGATGAAATCCCTGTAGAGCCACATAATCGACAGGG 1400
 GTCTATGACTTTTGGAAAGACTCGAGGGTTTCAATGAATTTAGCAGAAAATAACTGCTATATAATTTTTTTGGCCACTAGCAGCATGGCTAGTGGTGACAATGCTCATGG 1520
 CGCGTCCGCCCTTTGACCAAAAACAGAAATCTCAACAATGTTGGATGATTTGCAATAAAATCTGGGGCCCAAGGATGACTCTGATGACTTTGTGGATCTCTGACTTTCT 1640
 CAATGCCACTATCGCCAAAATTTATTTGTCAGCAGCTTCTGACGAAAATAACTGCAAAAATAACTGCTCAAAATGAAAAA

lepr-S3
CTGACACATGCTGCTAGTGTGACATGTGCTGCGTCCACCACTTGGCTAGACAGAATCTCAACAACCTGTTGGATGATTGCCATAAAATCATGGTCCCAAGAGGATG 1280
 L D T W L * 304

ACTCTGTGATCTTGTGATCTTCTTCTAGTGGCTATCTGCGCAAGTTTTATTTGTCAGTACTTCTGAGCAAAAATACTGCAAAAAGTAAATGCTCAATCAAAAAA

下划线部分氨基酸序列为 *lepr* 保守结构。The amino acid sequence of *lepr* gene conserved domains are underlined.

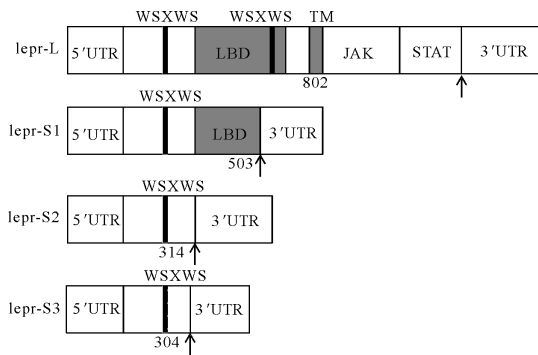
图 1 鳊 *lepr-L*、*lepr-S1*、*lepr-S2* 和 *lepr-S3* 基因的核苷酸和编码氨基酸序列比对

Fig.1 Nucleotide sequence and amino acid sequences alignment of *lepr-L*, *lepr-S1*, *lepr-S2* and *lepr-S3* in Chinese perch

表 2 鳊与其他脊椎动物 LBD 结构域氨基酸序列同源性比较

Table 2 Amino acid homology comparison of LBD domain between Chinese perch and other vertebrates

物种 Species	人 <i>H. sapiens</i>	小鼠 <i>M. musculus</i>	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	黑鲫 <i>C. carassius</i>	虹鳟 <i>O. mykiss</i>	大西洋鲑 <i>S. salar</i>	罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	欧洲鲈 <i>D. labrax</i>	鳊 <i>S. chuatsi</i>
人 <i>H. sapiens</i>	100.00									
小鼠 <i>M. musculus</i>	87.02	100.00								
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	26.09	26.09	100.00							
黑鲫 <i>C. carassius</i>	29.17	30.09	61.32	100.00						
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	32.09	34.11	39.86	35.44	100.00					
大西洋鲑 <i>S. salar</i>	32.09	34.27	39.86	36.41	98.09	100.00				
罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	29.67	30.29	39.86	33.49	47.09	47.57	100.00			
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	31.75	32.86	33.82	35.85	47.57	48.06	74.40	100.00		
欧洲鲈 <i>D. labrax</i>	32.70	32.86	39.13	36.84	45.15	45.63	73.91	83.09	100.00	
鳊 <i>S. chuatsi</i>	31.43	31.92	42.25	36.02	48.31	48.79	75.00	87.02	86.06	100.00



黑色方块表示“WSXWS”基序；箭头位置指示终止密码子；TM：跨膜区。The black bar means “WSXWS” motif; arrows indicates the location of stop codon; TM: Transmembrane domain.

图 2 鳊 lepr-L、lepr-S1、lepr-S2、lepr-S3 的结构域示意图

Fig.2 Schematic description of domains for the lepr-L, lepr-S1, lepr-S2 and lepr-S3 of Chinese Perch

2.5 腹腔注射鳊 leptin A 和 leptin B 同源重组蛋白对脑 lepr-L 表达的影响

图 6 所示为腹腔注射鳊同源重组 leptin A 和 leptin B 2 h 和 4 h 后，脑组织中 lepr-L 的表达情况。注射 leptin A 2 h 和 4 h 对鳊脑组织中 lepr-L 的表达均无显著影响 ($P > 0.05$)；注射 leptin B 2 h 鳊脑组织中 lepr-L 的表达水平显著上调

($P < 0.05$)，注射 leptin B 4 h 后未观察到鳊脑组织中 lepr-L mRNA 丰度的显著变化 ($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究采用 3' RACE 克隆的方法，获得了由 mRNA 3' 端可变剪切产生鳊的 4 种 lepr 亚型，包括 1 个长受体亚型和 3 个短受体亚型。氨基酸多重比对和进化树分析发现，鳊 lepr 及其 LBD 区域均较为保守，与同属鲈形目的欧洲鲈和石斑鱼的同源性最高，亲缘关系最近，其次是鲤科鱼类，与两栖动物和哺乳动物的同源性较低，亲缘关系最远。这与在其他鲈形目鱼类中得到的结果相一致^[8,11,24]。

本研究中使用 3' RACE 克隆得到鳊的 4 种亚型的 lepr，与哺乳动物和其他鱼类一致的是，长型受体亚型 lepr-L 具有完整的功能结构域，包括：信号肽、LBD、FNIII，重复的 WSXWS、Ig-C2-like、跨膜区、细胞膜内的 JAK-STAT 结构域。鳊 lepr-S1 含有 LBD，完全缺失了跨膜结构域和胞内域，推测其可能是可溶性 leptin 受体。在哺乳动物和鱼类中，可溶性受体与循环瘦素结合，避免瘦素被降解，进而调节瘦素的浓度和活动^[9,23,25]。鳊短受体亚型 lepr-S1 结构与哺乳动物和虹鳟的可溶性受体相

```

D.rerio (NP_001106847.1) EGRFNAIT ESEYSYVDI IYAYG----- -CRRQYRS-- ----- KCTEEAEBEDT
C.carassius (ADZ75460.1) QGMFNATD QSKNSEEDR RCEWNKSTWA QVRLLYSSRQ HTMCEITISEV EGSEAEBSM
S.chuatsi -EGASLIND ETN-GDIDR DCSWKNTQWT EPKFRSRWAD LP-CDVMEER ERAGKNVGEM
E.coioides (AFU55262.1) -QGASLIND ETN-GDIDR TCSWKSTQWT RLKFRSRWAD LQ-CDVMEER ERAGEKVGEM
D.labrax (KF918755) -EGASLIND ETN-GDIDR DCRWKNVWVT QLKLSWVAN LP-CDVMEER ERAGENVGEM
O.niloticus (KF955990) -EGADLIDK VTN-GDIDR DCSWTHKQLT KLFRRSRKAD LS-CDVMEER ERAGENLGM
O.mykiss (AGC55253.1) -KDFVLISS VTS-GDIDR TCRWNNLPIG GINFMRSVAD LS-CDVMEEA ERVGVVGVV
S.salar (NP_001158237.1) -KDFVLISS VTN-GDIDR TCRWNNLPIG GINFMRSVAD LS-CDVMEEA ERVGVVGVV
H.sapiens (AAA93015.1) -IDVNISS ETD-GYLTK TCRWSTSTIQ SLAESTLQLR YH-RSSLYCS DIPSIHP-IS
M.musculus (AAC52705.1) -IDVNISS ETD-GYLTK TCRWSPSTIQ SLVGSTVQLR YH-RRSLYCF DPSIHP-IS

D.rerio (NP_001106847.1) SLVKECFPSKA GDHQLSQ ISMIFKFW LEVEGGRG-- SFEVYVPI DYVKFSPFD
C.carassius (ADZ75460.1) SLVKECFPSGA GDHQLRN LSLYSKFW LEVEGGHGKV SFEVYVPI DYVKPFPSD
S.chuatsi GPA-CLQVRS R-HQTIQP LRMN-YKLV LEVPSRLGPI SKDIYLGPI DHVKHPTPN
E.coioides (AFU55262.1) GPS-CLQVRS K-QQTIQP LRMN-YKLV LEVPSRLGPI SKDIYLGPI DHVKHPTPN
D.labrax (KF918755) GPD-CLQVRS Q-QQTIQP LRMN-YKLV LEMPSRLGPI SKDIYLGPI DHVKHPTPN
O.niloticus (KF955990) GPA-CMEGG- --QTIHP LRMN-YKLV LELEPSQLGPI SKDIYLVPI DHVKHPTPN
O.mykiss (AGC55253.1) RQAKCESSGY RGVSLQP IRVTSKLV MEAKTDN-ST SFEVYVPI DHVKHPTPN
S.salar (NP_001158237.1) RQAKCESSGY RGVSLQP IRVTSKLV MEAKTDN-SM SFEVYVPI DHVKHPTPN
H.sapiens (AAA93015.1) EPKDCYLQSD G-PSEFQP IFLLSPTM IRINHSLGSL SPTCVIPI SVKRLPSS
M.musculus (AAC52705.1) EPKNCVLQRD G-PSEFQP IFLLSPTM IRINHSLGSL SPTCVIPI SVKRLPSS

D.rerio (NP_001106847.1) LEAHTLP-SK LSVRKRFS LBYDIOYEL QFKA--LAGM ANTQWKVIGP LLEPQAEIQL
C.carassius (ADZ75460.1) LEAHTLP-NK LSVSRREN LBYDIOYEL RFVA--LRDM PNTQWKVIGP LLEPQAEVQL
S.chuatsi VKVRSRS-SG LKLVTEFS LVEGDCQF RYVSSPSAVR AQPEWKVQSP VRVPWAEVAV
E.coioides (AFU55262.1) VKVRSRS-SG LKLVTEFS LVEGDCQF RYHS-PSAVR AQPEWKVQSP VRVPWAEVAV
D.labrax (KF918755) VKVRSQS-SG LKLVTEFS LVDGDCQF RYHS-PSAVR AQPEWKVQSP VRVPWAEVAV
O.niloticus (KF955990) VKVSHS-SG LKLVTEFS LVDGDCQF QYHS-PSAVR PRPKWKLQDP VRVPWAEVAV
O.mykiss (AGC55253.1) LKLVTEFS LBYDIOYQV RYAL--STGK AHPFWQLAL QTESWAEVLE
S.salar (NP_001158237.1) LKLVTEFS LBYDIOYQV RYAL--STGR AHPFWQLAL QTESWAEVLE
H.sapiens (AAA93015.1) VKBITINIG LKLVTEFS LKLVTEFS LKLVTEFS LKLVTEFS LKLVTEFS LKLVTEFS
M.musculus (AAC52705.1) VKBITVNTG LKLVTEFS LKLVTEFS LKLVTEFS LKLVTEFS LKLVTEFS LKLVTEFS

D.rerio (NP_001106847.1) EESVQFVE VRCRDVND YVSDWNSHI STVFN
C.carassius (ADZ75460.1) AESVQFVE VRCRLNG YVSDWMSYT SVVYN
S.chuatsi SVVQVYVQ VRCHTNG YVSDWKSIVY STPQN
E.coioides (AFU55262.1) PDMRVYVQ VRCHTSG YVSDWDSVY STPQN
D.labrax (KF918755) ADMREYVQ VRCPTNG YVSDWNSVY STPQN
O.niloticus (KF955990) PDMRVYVQ VRCHTNG YVSDWDSVY STPQN
O.mykiss (AGC55253.1) PDMRVYVQ VRCHTNG YVSDWNSVY STPQN
S.salar (NP_001158237.1) PDMRVYVQ VRCHTNG YVSDWNSVY STPQN
H.sapiens (AAA93015.1) PDMRVYVQ VRCRLDG YVSDWNSPAY TVVMD
M.musculus (AAC52705.1) SDLRVYVQ VRCRLDG YVSDWNSPAY TVVMD

```

黑色底纹表示氨基酸序列一致 Black shading indicates that the amino acid sequence is consistent.

图 3 鳊和其他脊椎动物 LBD 结构域氨基酸序列多重比对

Fig.3 Amino acid sequence alignment of the LBD domain of Chinese perch and various vertebrates *lepr* gene

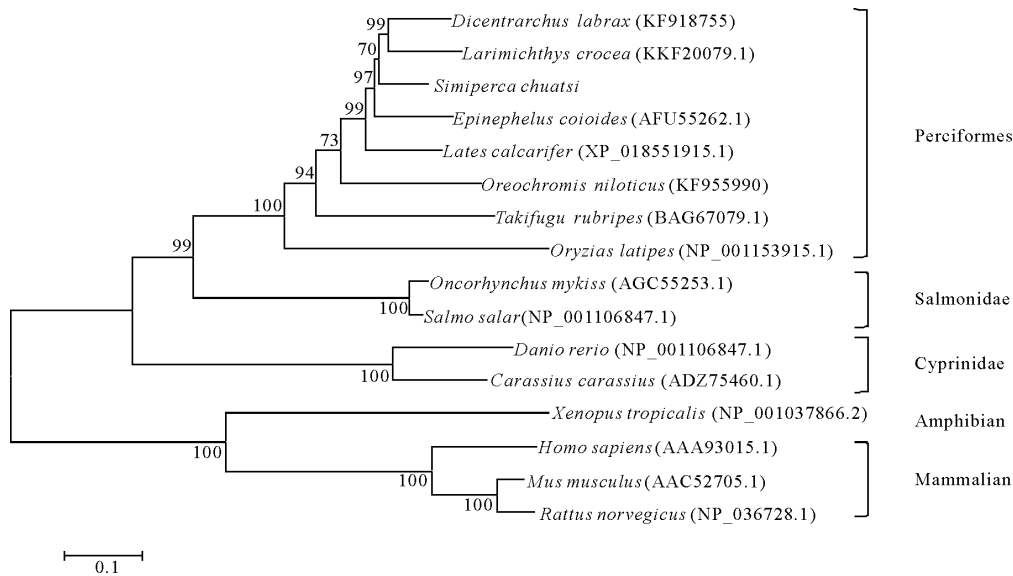
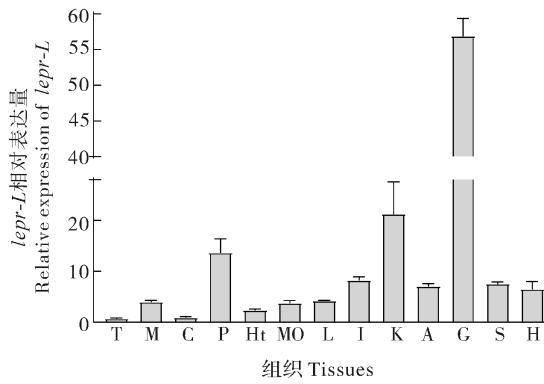


图 4 脊椎动物 lepr 氨基酸系统进化树

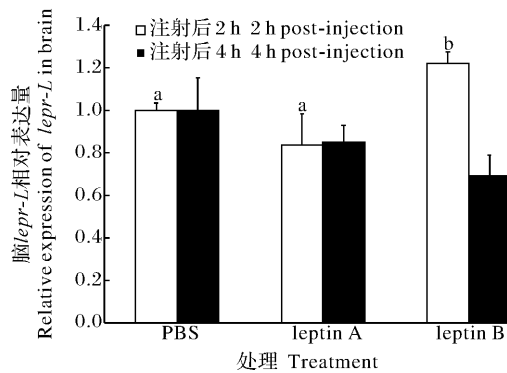
Fig.4 The phylogenetic tree analysis of vertebrate *lepr* amino acids sequences



T:端脑 Telencephalon; M:中脑 Midbrain; C:小脑 Cerebellum; P:垂体 Pituitary; Ht:下丘脑 Hypothalamus; MO:延脑 Medulla oblongata; L:肝脏 Liver; I:肠 Intestines; K:肾脏 Kidney; A:脂肪组织 Adipose; G:鳃 Gill; S:脾脏 Spleen; H:心脏 Heart.

图 5 lepr-L 在鳊各组织中的表达模式

Fig.5 Expression pattern of lepr-L in Chinese perch



含有不同字母的组别之间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 数据以平均值 ± 标准误差表示 ($n = 6$)。Values within the same row with superscripted letters represent significant difference ($P < 0.05$), data are expressed as mean ± S.E ($n = 6$)。

图 6 腹腔注射鳊 leptin A 和 leptin B 同源重组蛋白对脑 lepr-L 表达的影响

Fig.6 The expression of lepr-L after acute leptin A and leptin B administration

似,我们推测鳊短受体亚型 lepr-S1 应当具备分泌型受体的功能,可能具备调节血浆 leptin 浓度的功能。而鳊短型受体亚型 lepr-S2 和 lepr-S3 仅含有一个 WSXWS,未见其他重要结构域,在其他鱼类中均未见报道类似的短型受体亚型,其生理功能还需进一步探究。

在鱼类中,lepr 在各组织中的表达分布情况与物种相关,例如在金鱼^[26]、欧洲鳗鲡^[27]和大西洋鲑^[12]的端脑、下丘体和性腺中 lepr 表达量最高,在罗非鱼的垂体中 lepr 表达最多,其次是肌肉和头肾^[26],日本青鳉的 lepr 则在肌肉中表达量最高,其

次是皮肤和鳃^[6]。在我们的研究中,鳊 lepr-L 在鳃中表达最高,其次是肾脏和垂体。此类 lepr 组织表达分布的差异可能说明 leptin 在不同的物种中发挥的作用不尽相同。

在哺乳动物中,leptin 作为一种饱食因子,通过与专一性受体 lepr 结合发挥其抑制食欲的生理功能^[14-15]。草鱼^[28]、鳊^[22]、罗非鱼^[29]等鱼类腹腔注射同源重组的 leptin 蛋白后均表现出食欲降低,因此,leptin 在鱼类中也被认为具有抑制食欲的作用。同时,敲除 lepr 基因的日本青鳉也表现出食欲增强^[30],也验证了上述观点。然而,lepr 敲除的斑马鱼却未表现出食欲的增加^[31]。在我们的研究中发现,腹腔注射鳊 leptin B 同源重组蛋白 2 h 后,鳊食欲显著降低^[22],脑中 lepr 的表达量随之升高,在注射 4 h 后,鳊食欲恢复的同时^[22],脑中 lepr 的表达量也随之降低;而注射鳊 leptin A 同源重组蛋白 2 h 及 4 h 后,既未观察到食欲明显降低^[22],也未观察到脑组织中 lepr 表达的变化。由此,我们推测,鱼类不同的 leptins 在不同的组织中对 lepr 表达的影响不一致,从而行使不同的生理功能。

本研究首次克隆出由 mRNA 3' 端可变剪切产生的鳊 lepr 的 4 个受体亚型。经序列分析发现,仅长型受体 lepr-L 具有完整的功能结构域,且各功能结构域的氨基酸序列高度保守。短型受体亚型 lepr-S1 完全缺失跨膜区域和胞内结构域,推测其为可溶性受体亚型,发现了 2 个在其他鱼类中未见报道的、仅具备 1 个 WSXWS 结构的 lepr 短型受体亚型。鳊 lepr 基因在鳃、肾和垂体中表达量较高;注射鳊 leptin B 而非 leptin A 的同源重组蛋白会引起脑 lepr 表达量上升。这些结果说明鳊 leptins 能引起组织中 lepr 的表达的不同变化而发挥独特的生理功能。

参考文献 References

[1] ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. Nature, 1994, 372(6505): 425-432.

[2] PFISTER-GENSKOW M, HAYES H, EGGEN A, et al. Chromosomal localization of the bovine obesity (OBS) gene[J]. Mammalian genome, 1996, 7(5): 398-399.

[3] TARTAGLIA L A, DEMBSKI M, WENG X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R[J]. Cell, 1995, 83(7): 1263-1271.

- [4] WADA N, HIRAKO S, TAKENOYA F, et al. Leptin and its receptors[J]. *Journal of chemical neuroanatomy*, 2014, 61/62: 191-199.
- [5] WONG M M L, YU R M K, NG P K S, et al. Characterization of a hypoxia-responsive leptin receptor (omLepRL) cDNA from the marine medaka (*Oryzias melastigma*) [J]. *Marine pollution bulletin*, 2007, 54(6): 797-803.
- [6] DE KUROKAWA T, MURASHITA K. Genomic characterization of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in the Japanese medaka, *Oryzias latipes* [J]. *General and comparative endocrinology*, 2009, 161(2): 229-237.
- [7] LIU Q, CHEN Y, COPELAND D, et al. Expression of leptin receptor gene in developing and adult zebrafish [J]. *General and comparative endocrinology*, 2010, 166(2): 346-355.
- [8] ZHANG H X, CHEN H P, ZHANG Y, et al. Molecular cloning, characterization and expression profiles of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *General and comparative endocrinology*, 2013, 181: 295-305.
- [9] GONG N P, EINARSDOTTIR I E, JOHANSSON M, et al. Alternative splice variants of the rainbow trout leptin receptor encode multiple circulating leptin-binding proteins [J]. *Endocrinology*, 2013, 154(7): 2331-2340.
- [10] CAO Y B, XUE J L, WU L Y, et al. The detection of 3 leptin receptor isoforms in crucian carp gill and the influence of fasting and hypoxia on their expression [J]. *Domestic animal endocrinology*, 2011, 41(2): 74-80.
- [11] ESCOBAR S, ROCHA A, FELIP A, et al. Leptin receptor gene in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): cloning, phylogeny, tissue distribution and neuroanatomical organization [J]. *General and comparative endocrinology*, 2016, 229: 100-111.
- [12] RÖNNESTAD I, NILSEN T O, MURASHITA K, et al. Leptin and leptin receptor genes in Atlantic salmon: cloning, phylogeny, tissue distribution and expression correlated to long-term feeding status [J]. *General and comparative endocrinology*, 2010, 168(1): 55-70.
- [13] COPELAND D L, DUFF R J, LIU Q, et al. Leptin in teleost fishes: an argument for comparative study [J/OL]. *Frontiers in physiology*, 2011, 2: 26 [2020-12-14]. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00026>.
- [14] SCHWARTZ M W, NISWENDER K D. Adiposity signaling and biological defense against weight gain: absence of protection or central hormone resistance? [J]. *The journal of clinical endocrinology & metabolism*, 2004, 89(12): 5889-5897.
- [15] AHIMA R S, OSEI S Y. Leptin signaling [J]. *Physiology & behavior*, 2004, 81(2): 223-241.
- [16] DE PEDRO N, MARTÍNEZ-ALVAREZ R, DELGADO M J. Acute and chronic leptin reduces food intake and body weight in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *The journal of endocrinology*, 2006, 188(3): 513-520.
- [17] BAKER D M, LARSEN D A, SWANSON P, et al. Long-term peripheral treatment of immature coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with human leptin has no clear physiologic effect [J]. *General and comparative endocrinology*, 2000, 118(1): 134-138.
- [18] SILVERSTEIN J T, PLISETSKAYA E M. The effects of NPY and insulin on food intake regulation in fish [J]. *Integrative and comparative biology*, 2000, 40(2): 296-308.
- [19] LONDRAVILLE R L, DUVAL C S. Murine leptin injections increase intracellular fatty acid-binding protein in green sunfish (*Lepomis cyanellus*) [J]. *General and comparative endocrinology*, 2002, 129(1): 56-62.
- [20] 张真, 梁旭方, 徐晶, 等. PYY 组织表达及对翘嘴鲌的摄食调控 [J]. *华中农业大学学报*, 2020, 39(1): 136-143. ZHANG Z, LIANG X F, XU J, et al. Tissue expression and food intake attenuation effect of peptide YY in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2020, 39(1): 136-143 (in Chinese with English abstract).
- [21] 朱强胜, 何珊, 梁旭方, 等. 组氨酸及组胺对翘嘴鲌摄食调控的影响 [J]. *华中农业大学学报*, 2020, 39(6): 180-186. ZHU Q S, HE S, LIANG X F, et al. Effect of histidine and histamine on feeding regulation of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2020, 39(6): 180-186 (in Chinese with English abstract).
- [22] YUAN X C, LIANG X F, CAI W J, et al. Differential roles of two leptin gene paralogues on food intake and hepatic metabolism regulation in mandarin fish [J/OL]. *Frontiers in endocrinology*, 2020, 11: 438 [2020-12-14]. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00438>.
- [23] LAHLOU N, ISSAD T, LÉBOUC Y, et al. Mutations in the human leptin and leptin receptor genes as models of serum leptin receptor regulation [J]. *Diabetes*, 2002, 51(6): 1980-1985.
- [24] SHPILMAN M, HOLLANDER-COHEN L, VENTURA T, et al. Production, gene structure and characterization of two orthologs of leptin and a leptin receptor in tilapia [J]. *General and comparative endocrinology*, 2014, 207: 74-85.
- [25] LAHLOU N, CLEMENT K, CAREL J C, et al. Soluble leptin receptor in serum of subjects with complete resistance to leptin: relation to fat mass [J]. *Diabetes*, 2000, 49(8): 1347-1352.
- [26] TINOCO A B, NISEMBAUM L G, ISORNA E, et al. Leptins and leptin receptor expression in the goldfish (*Carassius auratus*). Regulation by food intake and fasting/overfeeding conditions [J]. *Peptides*, 2012, 34(2): 329-335.
- [27] MARINA M, P JÉRÉMY, RON D, et al. Duplicated leptin receptors in two species of eel bring new insights into the evolution of the leptin system in vertebrates [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126008 [2020-12-14]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126008>.
- [28] LI G G, LIANG X F, XIE Q L, et al. Gene structure, recombinant expression and functional characterization of grass carp leptin [J]. *General and comparative endocrinology*, 2010, 166

- (1):117-127.
- [29] LIU C Z, HE A Y, NING L J, et al. Leptin selectively regulates nutrients metabolism in Nile tilapia fed on high carbohydrate or high fat diet[J/OL]. *Frontiers in endocrinology*, 2018, 9:574 [2020-12-14]. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00574>.
- [30] SCHWARTZ M W, NISWENDER K D. Adiposity signaling and biological defense against weight gain: absence of protection or central hormone resistance? [J]. *Journal of clinical endocrinology & metabolism*, 2004(12):5889-5897.
- [31] MICHEL M, PAGE-MCCAW P S, CHEN W B, et al. Leptin signaling regulates glucose homeostasis, but not adipostasis, in the zebrafish[J]. *PNAS*, 2016, 113(11):3084-3089.

Molecular cloning and expression analysis of leptin receptor gene in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)

WEI Junran, LIANG Xufang, XU Jing, CAI Wenjing

*College of Fisheries/ Chinese Perch Research Center, Huazhong Agricultural University/
Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/
Hubei Engineering Technology Research Center for Fish Breeding and Healthy
Aquaculture, Wuhan 430070, China*

Abstract The coding sequence of the leptin receptor (*lepr*) gene in Chinese perch was obtained by RACE cloning method, and four different subtypes of *lepr* from alternative splicing of the 3' end of mRNA were obtained. The long-form receptor *lepr-L* was 3 474 bp in length encoding 1 157 amino acids, and three short subtypes of leptin receptor were *lepr-S1*, *lepr-S2* and *lepr-S3*, with coding sequence of 1 512 bp, 945 bp, and 915 bp in length, encoding 503, 314 and 304 amino acids, respectively. Sequence analysis and multiple amino acid sequences alignment revealed that the *lepr-L* contains complete functional domains exclusively, none of the short receptor subtype contains the transmembrane region and intracellular structure, and *lepr* and its leptin binding domain (LBD) sequence are highly conserved. The *lepr* gene is highly expressed in the gill, followed by the kidney and pituitary. The *lepr* mRNA abundance significantly increased at 2 h after intraperitoneal injection of the homologous recombination leptins protein B not A ($P < 0.05$). These results indicated that different leptins may lead to different expression changes of *lepr* mRNA, and lead to various physiological functions.

Keywords Chinese perch; leptin receptor; RACE; gene cloning; gene function; feeding regulation; receptor subtype; full food factor

(责任编辑:边书京)