



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

## 《天津科技大学学报》网络首发论文

题目： 卤虫长链脂肪酸延长酶 Elovl7 的分子特征及功能  
作者： 宋孟雨，邓洪刚，高美荣，马颖超，董春明，隋丽英  
DOI： 10.13364/j.issn.1672-6510.20250038  
收稿日期： 2025-03-04  
网络首发日期： 2025-07-29  
引用格式： 宋孟雨，邓洪刚，高美荣，马颖超，董春明，隋丽英. 卤虫长链脂肪酸延长酶 Elovl7 的分子特征及功能[J/OL]. 天津科技大学学报.  
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250038>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



# 卤虫长链脂肪酸延长酶 Elov17 的分子特征及功能

宋孟雨<sup>2</sup>, 邓洪刚<sup>2</sup>, 高美荣<sup>1,2</sup>, 马颖超<sup>1,2</sup>, 董春明<sup>1</sup>, 隋丽英<sup>1,2</sup>

(1. 海洋资源化学与食品技术教育部重点实验室, 天津科技大学海洋与环境学院, 天津 300457;

2. 亚洲区域卤虫参考中心, 天津科技大学海洋与环境学院, 天津 300457)

**摘要:** 为阐明旧金山卤虫 (*Artemia franciscana*) 长链脂肪酸延长酶 7 (Elov17) 在长链多不饱和脂肪酸 (LC-PUFA) 生物合成中的功能特性及其分子机制, 通过分子克隆、生物信息学分析和酿酒酵母异源表达, 表征 Elov17 的结构与功能特性。卤虫 *elov17* 开放阅读框长度为 822 bp, 编码 273 个氨基酸, 蛋白质相对分子质量为  $7.01 \times 10^4$ , 理论等电点为 5.14, 预测具有 7 个跨膜结构域和典型 ELO 功能域特征 (氧化还原中心组氨酸基序 HXXHH), 其中核心结构域 ELO\_CS (148~156 个氨基酸) 位于蛋白的第 6 条  $\alpha$ -螺旋。系统发育树显示卤虫 Elov17 蛋白形成独立分支, 与已知 Elov17/7-like 蛋白最高相似度仅为 45.24%, 表明其独特的进化地位。酿酒酵母异源表达结果显示, Elov17 对 C18 底物具有催化活性, 能够将亚油酸 (C18:2n-6) 和  $\alpha$ -亚麻酸 (C18:3n-3) 分别延长为二十碳二烯酸 (C20:2n-6, 转化率 11%) 和二十碳三烯酸 (C20:3n-3, 转化率 21%), 其催化效率显著高于已报道的 Elov1 同工酶, 这可能与卤虫生存的特殊环境 (如低温和高盐等) 密切相关。本研究揭示了卤虫 Elov17 的独特进化地位及其高效延长酶活性, 为卤虫 LC-PUFA 合成网络解析提供了关键酶学证据, 同时为开发卤虫活性物质提供理论依据。

**关键词:** 脂肪酸延长酶; 不饱和脂肪酸; 生物信息学分析; 异源表达; 卤虫

中图分类号: Q55

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

## Molecular Characterization and Functional Elucidation of Long-Chain

### Fatty Acid Elongase Elov17 in *Artemia*

SONG Mengyu<sup>2</sup>, DENG Honggang<sup>2</sup>, GAO Meirong<sup>1,2</sup>, MA Yingchao<sup>1,2</sup>, DONG Chunming<sup>1</sup>, SUI Liying<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Resource Chemistry and Food Technology (TUST) of Ministry of Education, College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2. Asian Regional Artemia Reference Center, College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** To elucidate the functional characteristics and molecular mechanisms of long-chain fatty acid elongase 7 (Elov17) from *Artemia franciscana* in long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) biosynthesis, we employed molecular cloning, bioinformatics analysis, and a *Saccharomyces cerevisiae* heterologous expression system for structural and functional characterization. The *elov17* open reading frame (ORF) spans 822 bp, encoding a 273-amino acid polypeptide with a calculated molecular weight of  $7.01 \times 10^4$  and a theoretical isoelectric point of 5.14. Structural predictions revealed seven transmembrane domains along with characteristic ELO domain features, including the conserved redox-active center histidine motif (HXXHH). Notably, the core catalytic domain ELO\_CS (residues 148-156) is positioned within the sixth  $\alpha$ -helix. Phylogenetic analysis demonstrated that *Artemia* Elov17 forms an independent clade, showing a maximum sequence similarity of only 45.24% with reported Elov17/7-like proteins, which suggests its distinct evolutionary position. Heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* revealed Elov17's catalytic activity toward C18 substrates, with effective elongation of

收稿日期: 2025-03-04; 修回日期: 2025-06-04

基金项目: 农业农村部渔业科技援藏项目 (125A0604)

作者简介: 宋孟雨(2000-), 男, 安徽阜阳人, 硕士研究生; 通信作者: 隋丽英, 教授, suily@tust.edu.cn

linoleic acid (C18:2n-6) to eicosadienoic acid (C20:2n-6; 11% conversion rate) and  $\alpha$ -linolenic acid (C18:3n-3) to eicosatrienoic acid (C20:3n-3; 21% conversion rate). The enzyme exhibited significantly higher catalytic efficiency compared to reported Elov1 isozymes, potentially associated with *Artemia*'s adaptation to extreme environmental conditions, particularly low temperature and hypersalinity. This study unveils the distinct evolutionary trajectory and remarkable elongation efficiency of *Artemia* Elov17, which provides crucial enzymatic evidence for deciphering the LC-PUFA biosynthetic network in brine shrimp and establishes the foundation for developing bioactive compounds from this extremophile organism.

**Key words:** fatty acid elongase; unsaturated fatty acids; bioinformatics analysis; heterologous expression; *Artemia*

长链多不饱和脂肪酸 (LC-PUFA) 是一类含有 3 个及以上双键的多烯直链脂肪酸, 其碳原子数量通常不少于 20 个。LC-PUFA 是细胞膜的重要组成部分, 对维持细胞膜的生理功能至关重要。常见的 LC-PUFA 包括花生四烯酸 (ARA, C20:4n-6)、二十碳五烯酸 (PA, C20:5n-3) 和二十二碳六烯酸 (DHA, C22:6n-3) 等<sup>[1]</sup>。LC-PUFA 能够促进水产经济动物大脑和视神经系统的发育, 优化脂肪分布, 改善肉质, 同时还能增强水产经济动物的抗氧化应激能力, 提升其免疫力和存活率<sup>[2]</sup>。虽然 LC-PUFA 在水产经济动物生命活动中发挥了重要作用, 但动物自身并不能从头合成 LC-PUFA, 需要从食物中直接摄入或获取合成的原料<sup>[3]</sup>。

卤虫 (*Artemia*) 广泛分布于高盐水体中, 如沿海日晒盐场和内陆盐湖<sup>[4]</sup>, 其营养丰富, 休眠卵易保存且孵化方便, 是水产经济动物的重要开口饵料<sup>[5]</sup>。然而, 卤虫无法自主合成 EPA/DHA, 需从食物中摄取 EPA/DHA 或其前体物质, 以满足水产育苗需求<sup>[6]</sup>。富硒酵母强化的卤虫含有更多的 LC-PUFA, 以此投喂大口黑鲈鱼, 能显著改善仔鱼的生长和存活率<sup>[7]</sup>。研究人员分析了投喂不同产地卤虫幼体对云龙石斑鱼幼苗的生长和抗胁迫能力的影响, 发现 LC-PUFA 的含量与鱼苗的生长和存活率呈现正相关<sup>[8]</sup>。由于环境温度、盐度和饵料的差异, 不同品系卤虫卵的脂肪酸 (尤其是 EPA) 含量有较大差别<sup>[9-10]</sup>。

长链脂肪酸延长酶 (Elov1) 是 LC-PUFA 生物合成的关键酶, 可以将短链脂肪酸延长为长链脂肪酸 (C $\geq$ 20)。目前已发现 7 种 Elov1 蛋白 (Elov11—7), 其对不同脂肪酸表现出不同的底物特异性<sup>[11]</sup>。Elov11/3/4/6 主要催化饱和及单不饱和脂肪酸的延长反应, 而 Elov12/4/5/7 主要催化多不饱和脂肪酸的延长反应<sup>[11]</sup>。分子进化研究表明, *elov1* 基因家族在棘皮动物、硬骨鱼类和家禽中呈现高度保守性, 其表达谱与性腺分化<sup>[12]</sup>、低温适应<sup>[13]</sup>及脂肪沉积调控<sup>[14]</sup>等生理过程显著相关。结构生物学研究进一步揭示, Elov17 具有典型的跨膜拓扑结构和保守催化基序<sup>[15]</sup>, 在甲壳类动物如海洋钩虾 (*Gammaridea*)<sup>[16]</sup>和榄绿

青蟹 (*Scylla olivacea*)<sup>[17]</sup>中具有延长酶活性, 能够将 C18 脂肪酸延长为 EPA、DHA 甚至是 C26 脂肪酸。卤虫包含 7 种 Elov1 蛋白, 且大部分具有延长酶活性, 其中 Elov17 的转化效率显著优于同家族其他成员<sup>[6]</sup>。虽然该研究揭示了卤虫 Elov17 的潜在重要性, 但是对该蛋白缺乏系统研究, 比如序列保守性、蛋白结构及其如何影响催化功能等。

近年来, 针对 Elov17 的多维度生物学功能研究取得了显著进展。该蛋白不仅参与表皮屏障形成、细胞增殖调控和生殖发育<sup>[15]</sup>, 其表达异常还被证实与多种病理过程密切相关。遗传学证据表明, Elov17 突变可引发常染色体隐性先天性鱼鳞病<sup>[18]</sup>, 并通过脂代谢重编程参与病毒复制调控<sup>[19]</sup>、巨噬细胞极化 (促进 THP-1 细胞 M1 型炎症因子分泌)<sup>[20]</sup>及肝纤维化进展<sup>[21]</sup>。在前列腺癌发生和发展过程中, Elov17 能够通过调节脂质代谢微环境发挥促癌效应, 因而被视为潜在治疗靶点<sup>[18]</sup>。基于机器学习和组学分析, 该蛋白在骨关节炎病理<sup>[22]</sup>、代谢综合征及非小细胞肺癌耐药机制中发挥作用<sup>[23]</sup>。

本研究围绕对延长脂肪酸碳链效率较高的 Elov17 的结构和功能开展深入研究。从卤虫中克隆获得 *elov17* 基因的开放阅读框 (ORF), 通过在线平台分析其蛋白结构和性质, 阐释结构对催化活性和稳定性的影响; 比较分析该蛋白在不同物种间的同源性, 展现其独特的进化地位; 通过酵母异源表达探究其在 LC-PUFA 合成过程中的功能。研究成果有助于揭示卤虫 LC-PUFA 合成的分子机制, 为进一步提高卤虫 LC-PUFA 含量以及卤虫活性物质的开发应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 卤虫卵样本信息

亚洲区域卤虫参考中心卤虫种质资源库中收录的旧金山卤虫 (*Artemia franciscana*, AR-ARC

编号: USA-SL-40), 源自美国大盐湖。

### 1.1.2 仪器与试剂

甲醇、甲苯、正己烷, 分析纯, 天津江天化工技术股份有限公司; 乙酰氯, 分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 6× Loading Buffer、DNA Marker、Premix Ex Taq、PrimeSTAR® Max DNA Polymerase、TB Green Premix Ex Taq II、RNase Free ddH<sub>2</sub>O、反转录试剂盒、琼脂糖快速回收/纯化试剂盒、T4 DNA Ligase、限制性内切酶 *Kpn* I、限制性内切酶 *EcoR* I, 日本 TaKaRa 公司; pYES2-Vector、Top10 感受态细胞、pMD18-T Vector, 碧云天生物技术有限公司; 酿酒酵母 INVSc1 化学感受态细胞, 上海瑞楚生物科技有限公司; 质粒小提试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 酵母培养基(SD/Ura), 北京泛基诺科技有限公司; 棉子糖、半乳糖, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 脂肪酸内标液(C20:2n-6)、亚油酸(C18:2n-6)脂肪酸标准品、 $\alpha$ -亚麻酸(C18:3n-3)脂肪酸标准品, 美国 NU-CHEK 公司。

A24812 型 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司; BioPhotometer D30 型核酸浓度测定仪, 德国 Eppendorf 公司; Tanon 1600 型凝胶成像系统, 北京原平皓生物技术有限公司; Pilot5-8ES 型冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; GC-2014 型气相色谱仪, 日本岛津公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 卤虫培养

取适量卤虫卵在盐度 30、28 °C 条件下孵化 24 h, 将孵化后的无节幼体转移至新鲜卤水中, 养殖密度 500 个/L, 25 °C 标准化养殖 14 d, 期间投喂佐夫色绿藻 (*Chromochloris zofingiensis*) 并定期换水。

### 1.2.2 *elov17* 基因克隆

通过 Trizol 法提取卤虫总 RNA, 使用反转录试剂盒将其反转为 cDNA。基于 *elov17* 序列通过 Snap Gene 设计特异性引物(表 1), 经 PCR 扩增获得 *elov17* ORF 序列 ( $T_m$  为 58 °C), PCR 产物纯化后送至深圳华大基因股份有限公司测序。

表 1 *elov17* 基因扩增及验证引物

Tab. 1 Primers used for amplification and validation of the *elov17* gene

引物名称	引物序列 (5'-3')	用途
<i>elov17</i> -F1	ATGCTACCGGGCAGCA	ORF 验证
<i>elov17</i> -R1	TTAATCAACTTTTTAAAGCCATTACT	ORF 验证
<i>elov17</i> -F2	CGGGGTACCATGCTACCGGGCAGCA	功能鉴定
<i>elov17</i> -R2	CCGGAATTCTTAATCAACTTTTTAAAGCCATTACT	功能鉴定
<i>elov17</i> -F3	GGTGGATGGGAATGAAATA	qRT-PCR
<i>elov17</i> -R3	GGGACCAAAACCTGAGAGT	qRT-PCR

### 1.2.3 Elov17 的生物信息学分析

采用不同软件/在线平台对卤虫 Elov17 的性质进行分析。利用 ExPASy-ProtParam (<https://expasy.org/protparam/>) 对蛋白质相对分子质量、理论等电点 (pI)、氨基酸组成等理化性质进行分析。使用 ExPASy 进行相对分子质量和等电点的预测 (<https://web.expasy.org/>)。保守结构域和功能结构域通过 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>) 和 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 进行预测。TMHMM Server V 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/>) 用于预测蛋白的跨膜结构。SignalP-5.0 Server (<https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 用于信号肽的分析预测。ORF Finder-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 用于开放阅读框的分析。PSORT II Prediction (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) 用于亚细胞定位分

析。通过 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 预测蛋白质的二级结构。通过 NCBI 数据库和 DNAMAN 进行编码氨基酸序列的比对分析。AlphaFold3 (<https://www.nature.com/articles/>) 用于蛋白质三维结构的预测。利用 MEGA 软件, 采用最大似然法构建系统发育树。

### 1.2.4 Elov17 功能分析

参照酵母异源表达体系<sup>[24]</sup>进行 Elov17 功能验证。通过 ORF 序列设计携带 *Kpn* I 和 *EcoR* I 酶切位点的真核表达引物(表 1), PCR 扩增后经双酶切获得目的基因片段, 同步处理 pYES2 载体并进行 T4 连接酶介导的重组, 构建 pYES-*elov17* 表达质粒; 转化导入酿酒酵母 INVSc1 感受态细胞, 筛选阳性克隆进行诱导表达, 重组酵母置于含半乳糖的培养基中 30 °C 振荡培养至对数期, 分别加入终浓度为 0.5 mmol/L 亚油酸 (C18:2n-6) 和  $\alpha$ -亚麻酸 (C18:3n-3)

底物, 180 r/min 持续诱导 48 h, 菌体经 5000g 离心收集后冷冻干燥 24 h。

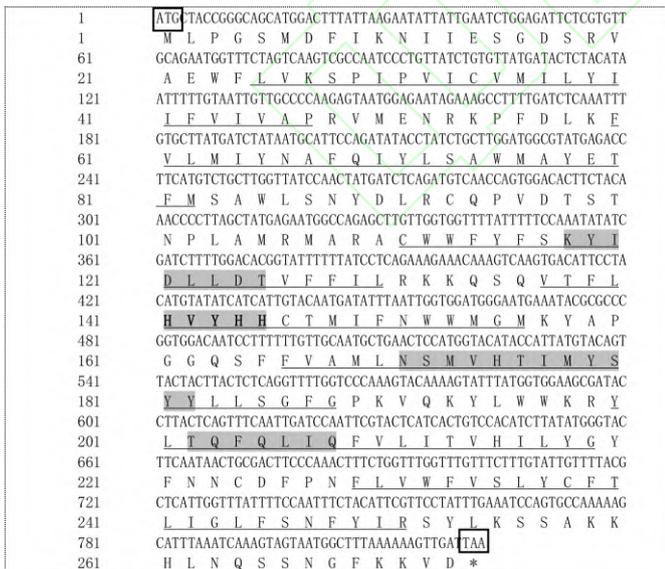
采用气相色谱内标法<sup>[8]</sup>进行脂肪酸甲酯化。称取 32 mg 冷冻干燥样品, 加入 5 mL 甲醇-甲苯(体积比 4:1) 混合液均质后, 与 5 mL 乙酰氯-甲醇(体积比 1:9) 衍生化试剂在氮气保护下 100 °C 反应 1 h; 冷却后经 5 mL 正己烷萃取 2 次、无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 脱水及旋转蒸发浓缩, 最终用正己烷复溶, 并经 0.22 μm 滤膜过滤。用气相色谱仪分析脂肪酸甲酯的组成和含量<sup>[8]</sup>, 产物峰面积与产物和底物峰面积和之比即为转化率。

## 2 结果与分析

### 2.1 Elov17 的生物信息学分析结果

#### 2.1.1 卤虫 Elov17 序列分析

卤虫 *elov17* 基因的 ORF 序列长度为 822 bp, 编码 273 个氨基酸(基因登录号 PQ650494)。ExPASy 预测结果显示, Elov17 蛋白的相对分子质量约为 7.01×10<sup>4</sup>, 理论等电点为 5.14, 具有 7 个跨膜结构域。该蛋白质具有典型的 Elov1 蛋白家族的结构特征, 其编码区域包含 3 个保守基序(KXXDXXDT、NXXXHXXMYXYY 和 TXXQXXQ)以及 1 个保守度较高的氧化还原中心组氨酸基序(HXXHH)。亚细胞定位预测发现, 蛋白序列中包含内质网滞留信号(图 1)。



注: 方框内为起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA), 阴影部分为保守区域, 加粗字体为组氨酸簇(HXXHH), 下划线为预测的 7 个跨膜区, 波浪线为内质网滞留信号。

图 1 *elov17* ORF 及氨基酸序列

Fig. 1 *elov17* ORF and amino acid sequence

#### 2.1.2 同源性分析

卤虫 Elov17 蛋白系统发育树显示, 卤虫 Elov17 蛋白与大部分 Elov17/7-like 蛋白聚为一类, 但其自身形成一个独立分支, 表明与其他物种存在较大差异(图 2)。氨基酸比对结果显示, 卤虫 Elov17 蛋白与蚤状蚤(*Daphnia pulex*)相似性较高, 为 45.24%, 斑节对虾(*Penaeus monodon*)和南美白对虾(*Penaeus vannamei*)次之(43.72%), 与榄绿青蟹(*Scylla olivacea*)相似度为 38.78%(图 3)。



图 2 卤虫 Elov17 蛋白与其他物种 Elov17 的最大似然法系统发育树

Fig. 2 ML phylogenetic tree of *Artemia* Elov17 protein and Elov17s in other species

卤虫 Elov17 和蚤状蚤 Elov17-like 氨基酸序列长度相对较短, 分别为 273 个氨基酸和 258 个氨基酸。而斑节对虾、南美白对虾和榄绿青蟹 Elov17-like 蛋白序列相对较长, 分别为 358 个氨基酸、358 个氨基酸、350 个氨基酸。氨基酸序列比对结果显示, 不同物种 Elov17/7-like 存在 4 个保守区, 其中 1 个高度保守的氧化还原中心组氨酸基序(HXXHH)位于对比图中的第 227—231 个氨基酸位置, 3 个保守基序(KXXDXXDT、NXXXHXXMYXYY、TXXQXXQ)分别位于第 204—211、257—268、288—294 个氨基酸位置。保守型较低, 差异较大的区域出现在第 1—100、362—422 个氨基酸位置(图 3)。

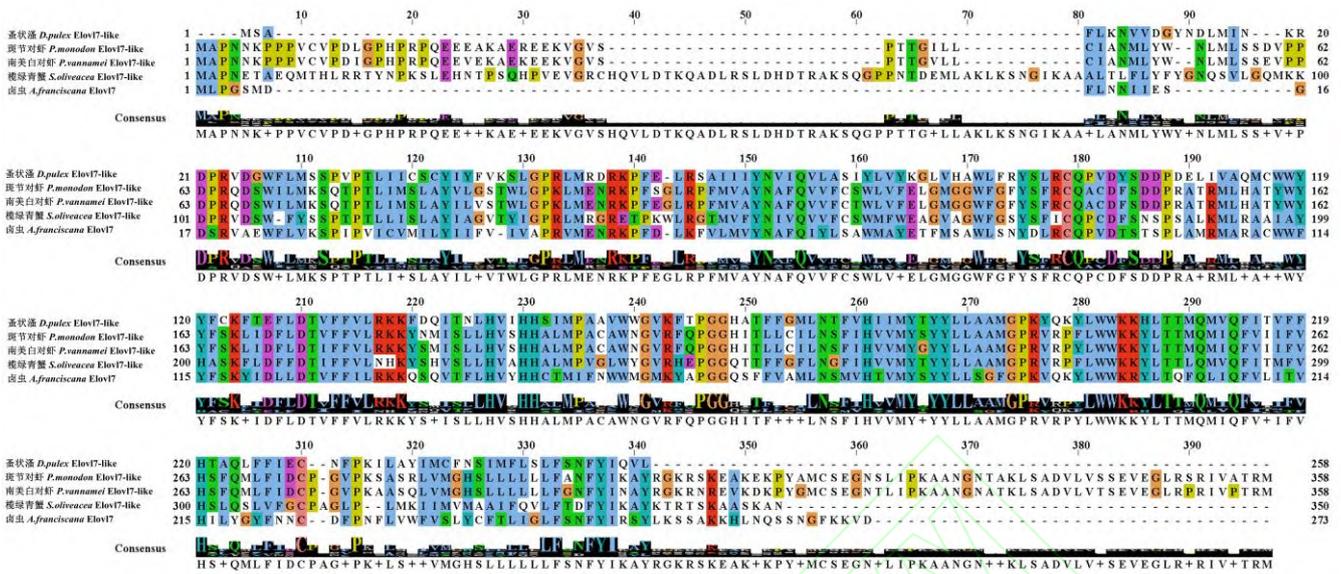


图3 卤虫 Elov17 与其他物种的氨基酸序列比对

Fig. 3 Multiple alignments of amino acid sequence of Elov17 from *Artemia* and other species

2.1.3 Elov17 蛋白结构分析

卤虫 Elov17 蛋白的二级结构预测结果显示, 蛋白质中  $\alpha$ -螺旋较多, 210 个氨基酸组成 9 个  $\alpha$ -螺旋, 另有 2 个氨基酸组成 1 个  $\beta$ -折叠(第 94—95 个氨基酸位置)。三级结构预测结果表明, 高比例的  $\alpha$ -螺旋和随机卷曲组成复杂的三级结构, 9 个  $\alpha$ -螺旋平行排列, 使卤虫 Elov17 蛋白形成圆柱形或棒状的螺旋束结构(图 4)。在三维结构中还发现 1 个负责长链脂肪酸延长功能结构域 ELO(第 24—260 个氨基酸位置), 该结构域包含 8 个  $\alpha$ -螺旋和 1 个  $\beta$ -折叠, 其核心结构域 ELO\_CS(第 148—156 个氨基酸位置)位于第 6 条  $\alpha$ -螺旋上。

2.2 Elov17 的功能

酿酒酵母 INVSc1 细胞本身含有 C16:0(峰 1)、C16:1n-7(峰 2)、C18:0(峰 3)和 C18:1n-7(峰 4) 4 种脂肪酸(图 5)。携带空载体 pYES2 的对照组酵母仅含有 INVSc1 自身的 4 种脂肪酸及添加的 2 种外源脂肪酸标准品, 分别为 C18:3n-3 和 C18:2n-6。在 INVSc1-pYES2-*elov17* 实验组酵母中, 除了上述几

种脂肪酸外, 还检测到 C20:3n-3 和 C20:2n-6 这 2 种 C20 脂肪酸。推测新生成的 C20:3n-3 是由  $\alpha$ -亚麻酸 C18:3n-3 延长产生, 转化率为 21%; 而 C20:2n-6 是由添加的亚油酸 C18:2n-6 延长产生, 转化率为 11%。这表明卤虫 Elov17 蛋白能够将 C18 脂肪酸的碳链延长到 C20 脂肪酸碳链。

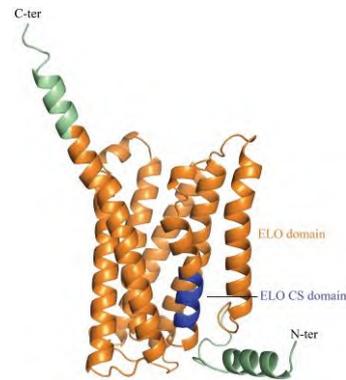
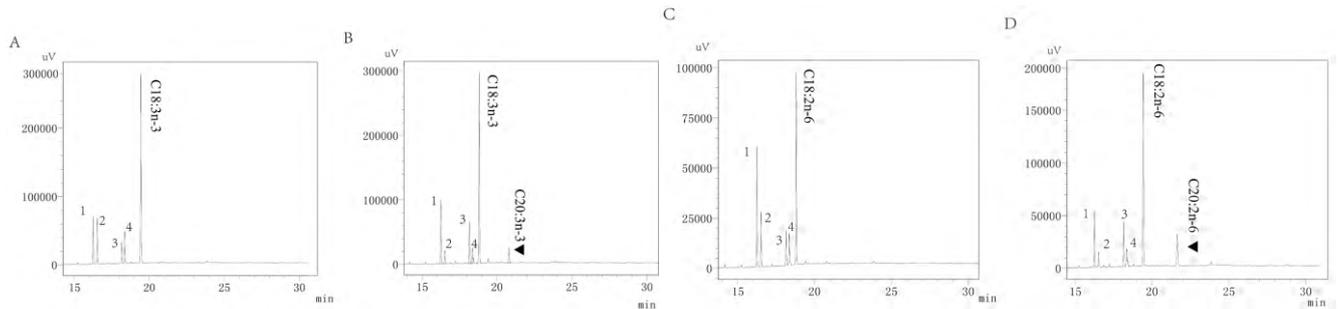


图4 卤虫 Elov17 蛋白的三级结构预测

Fig. 4 Tertiary structure prediction of *Artemia* Elov17 protein



注: 培养基添加底物为 C18:3n-3 (A/B)、C18:2n-6 (C/D); A/C 为含空载体 pYES2 质粒的酿酒酵母的脂肪酸组成; B/D 为含 pYES2-*elov17* 质粒的

酿酒酵母的脂肪酸组成；峰 1-4 分别表示酿酒酵母内源脂肪酸 C16:0、C16:1n-7、C18:0、C18:1n-7；延伸产物用三角符号标记。

图 5 不同底物培养的酿酒酵母中多不饱和脂肪酸组成

Fig. 5 Composition of polyunsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae* cultured with different substrates.

### 3 讨论

旧金山卤虫 (*Artemia franciscana*) 是卤虫属中首个被明确描述的两性生殖种, 具有重要分类学地位, 广泛分布于美国旧金山大盐湖, 是基础研究的重要研究对象<sup>[4]</sup>, 其产量相对稳定, 年产量约为 1000 t, 约占世界卤虫卵产量的 20%~30%, 且该地区生产的卤虫卵具有较高的孵化率 (通常为 90% 以上)。因此, 旧金山卤虫在发育生物学研究和水产养殖饲料产业中兼具重要科学价值与经济意义。

本研究从卤虫中克隆 *elovl7* 基因, 其 ORF 长度为 822 bp, 编码 273 个氨基酸。利用氨基酸序列构建的系统发育树结果显示, 卤虫 *Elov17* 蛋白与多数物种的 *Elov17/7-like* 蛋白聚为一类, 尤其是与甲壳动物相似性高于其他物种, 这与卤虫的分类地位一致。但是, 在大类下卤虫 *Elov17* 蛋白形成独立分支, 与其他 *Elov17* 蛋白仍存在较大差异, 相似性最高仅为 45.24%。这种差异可能源于其特殊的生存环境。卤虫常见于高原盐湖、海滨盐场等高盐环境中, 具有很强的环境适应性, 能够耐受高盐、缺氧、重金属、高温、低温等极端环境<sup>[25]</sup>。长期的地理隔离和自然选择压力导致卤虫与其他物种存在较大的遗传差异。已报道的卤虫其他功能性蛋白也存在类似情况, 如卤虫的性别分化和发育机制相关蛋白 DMRT (double-sex and mab-3 related transcription factor) 与甲壳动物的相似度为 49.4%~52.9%<sup>[26]</sup>, 卤虫的卵黄蛋白原与蚤状溞的相似性为 28%<sup>[27]</sup>等。这些结果进一步支持了卤虫蛋白具有独特的一级结构, 以应对其特殊的生存环境。

氨基酸序列比对结果显示, 尽管卤虫 *Elov17* 与其他物种的 *Elov17-like* 氨基酸序列存在显著差异, 但其核心区域高度保守, 包含典型的 *Elov1* 蛋白家族特征, 如 3 个保守基序和 1 个高度保守的氧化还原中心组氨酸簇 (HXXHH)。人类 *ELOVL7* 的研究发现, 组氨酸簇是延长酶的催化核心, 酰基辅酶 A 与组氨酸簇中的组氨酸发生转酰基化反应, 形成酰基咪唑中间体, 随后丙二酰辅酶 A 与酰基中间体发生缩合反应, 生成延长的 3-酮酰基辅酶 A 产物, 从而实现脂肪酸的延长<sup>[28]</sup>。组氨酸簇是去饱和酶和延长酶的活性位点, 在脂肪酸延长过程中参与电子传

递, 对酶的催化活性至关重要<sup>[29]</sup>。然而, 除组氨酸簇外, 本研究还预测到发挥延长功能的核心结构域 ELO\_CS (148-156 aa), 该结构域紧邻组氨酸簇。由此推测, 在卤虫 *Elov17* 中组氨酸簇和核心结构域协同发挥延长功能。

卤虫 *Elov17* 氨基酸序列预测显示其具有 7 个跨膜结构域, 与已报道的四指马鲛 (*Eleutheronema tetradactylum*) *Elov17* 蛋白的跨膜区域数量相同<sup>[30]</sup>, 反映了 *Elov1* 蛋白在膜定位和结构上的保守性。对于 *Elov1* 蛋白而言, 多个跨膜结构域能将其锚定在内质网膜上, 提高蛋白在极端环境 (如盐度、温度波动) 下的稳定性<sup>[9]</sup>, 为卤虫 *Elov17* 的功能发挥提供了结构保障。此外, 跨膜结构区还具有物质运输、信号转导、细胞间通讯等功能<sup>[31]</sup>, 因而可以增强底物脂肪酸的运输效率, 进而提高催化效率。

PSIPRED 和 AlphaFold3 预测发现, 卤虫 *Elov17* 蛋白的二级结构中, 包含 9 个  $\alpha$ -螺旋和 1 个  $\beta$ -折叠,  $\alpha$ -螺旋占比较高。这种结构特征与四指马鲛的 *Elov17* 蛋白相似, 后者的  $\alpha$ -螺旋占比 (40.86%~50.30%) 高于  $\beta$ -折叠 (2.38%~4.47%)<sup>[30]</sup>。这种高比例的  $\alpha$ -螺旋结构具有显著的优势。首先,  $\alpha$ -螺旋形成氢键的方式相对简单, 有利于蛋白质快速折叠<sup>[32]</sup>, 这对于卤虫在面对复杂环境时快速响应或修复蛋白损伤尤为重要。其次, 高占比的  $\alpha$ -螺旋使蛋白能够以“插入式”与其他分子结合<sup>[33]</sup>, 便于蛋白与脂肪酸底物进行高效识别和结合。此外,  $\alpha$ -螺旋形成的氢键更稳定, 有利于维持蛋白形态结构, 确保其功能的稳定性<sup>[34]</sup>。卤虫 *Elov17* 蛋白的三级结构预测结果显示, 该蛋白中的 9 个平行排列的  $\alpha$ -螺旋通过疏水相互作用、氢键和范德华力等非共价相互作用, 形成稳定的螺旋束结构。在 *Elov1* 蛋白中, 这种稳定的螺旋束结构提高了蛋白质的稳定性, 使其能有效抵御高盐渗透压、剧烈温度变化等极端环境压力带来的构象变化和功能丧失风险。同时, 平行螺旋束内部形成的疏水通道或口袋可能与脂肪酸链延长反应有关<sup>[28,34]</sup>。催化核心 ELO\_CS 也位于第 6 条  $\alpha$ -螺旋上, 表明在脂肪酸的延长过程中, 这些  $\alpha$ -螺旋参与底物的结合和催化反应。因此, 卤虫 *Elov17* 中高比例的  $\alpha$ -螺旋在维持蛋白结构稳定性、为脂肪酸提供结合位点以及催化脂肪酸延长反应等方面发挥重要功能。

LC-PUFA 的合成通常包括碳链延长和去饱和两

个方面, 而 Elov1 的主要功能为延长 LC-PUFA 的碳链。已有研究报道, 三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) Elov14-like 将 C18:2n-6 延长为 C20:2n-6 的转化率为 2.6%, C18:3n-3 延长为 C20:3n-3 的转化率为 7.8%<sup>[35]</sup>; 泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) Elov14 能够将 C18:2n-6 延长为 C20:2n-6, 转化率为 1.26%<sup>[36]</sup>; 卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) Elov14-like 将 C18:3n-6 延长为 C20:3n-6 的转化率为 0.83%, C20:5n-3 延长为 C22:5n-3 的转化率为 0.82%<sup>[37]</sup>。Ramos-Llorens 等<sup>[6]</sup>报道卤虫 Elov17 将 C18:2n-6 延长为 C20:2n-6 的转化率为 3.92%, C18:3n-3 延长为 C20:3n-3 的转化率为 8.08%。本研究获得的卤虫 Elov17 可将 C18:2n-6 延长为 C20:2n-6, C18:3n-3 延长为 C20:3n-3, 其转化率分别为 11%和 21%, 高于其他研究, 表明卤虫来源的 Elov17 在 LC-PUFA 合成中具有优势。

卤虫体内 LC-PUFA 含量增加能使细胞膜保持流动性和通透性, 维持细胞渗透压平衡, 还维持能量代谢, 提高抗氧化防御, 从而帮助卤虫抵御低温、高盐等不利环境<sup>[38]</sup>。低温条件可以促进卤虫长链脂肪酸延长酶 Elov14、脂肪酸去饱和酶 FADS、脂肪酸羟化酶 FAH、脂肪酸结合蛋白 FABP 等基因表达上调, 进而生成更多的 LC-PUFA 以适应低温环境<sup>[39]</sup>。喂食富含多不饱和脂肪酸 EPA 和 DHA 的单胞藻和破囊壶菌, 能够显著提高卤虫幼体的多不饱和脂肪酸的组成, 从而增强其营养价值和生存能力<sup>[40]</sup>。因此, 具有高效催化活性的 Elov17 能够通过提高 LC-PUFA 的含量, 提高卤虫对不利环境的抵抗力。

嗜盐生物卤虫的 Elov17 蛋白在淡水环境生存的酿酒酵母表达系统中表达成功, 且具有高效的催化活性, 这可能与其结构特性相关。尽管 Elov17 属于嗜盐蛋白, 其表面可能富集负电荷以维持在高盐环境下的溶解度, 但其内在高比例的  $\alpha$ -螺旋和稳定的螺旋束结构, 在低盐条件下仍能有效维持催化核心结构域的稳定性, 从而保障了酶活性位点的完整性和功能性<sup>[41]</sup>。此外, 卤虫 Elov17 的 7 个跨膜结构域中的疏水氨基酸梯度排列, 可能是蛋白质广谱温度适应性的关键要素。嗜热菌 (*Bacillus thermoproteolyticus*) 的蛋白酶通过疏水核心的紧密堆积 (Ile/Val/Leu 富集) 抵抗热诱导的变性, 保持蛋白质的三维结构稳定<sup>[42]</sup>。南极假单胞菌 (*Pseudomonas*) 的冷适应蛋白酶通过丙氨酸 (Ala) 和甘氨酸 (Gly) 在疏水界面的富集, 减少空间位阻, 增强低温下的构象可塑性, 从而维持其催化活性<sup>[43]</sup>。由此推测, 卤虫跨膜结构域中疏水氨基酸的排列,

使蛋白质的核心区域存在动态调整的空间, 以确保蛋白质在较宽温度范围内的活性和稳定性, 有效缓冲酵母标准培养条件与卤虫原生高盐湖环境 (通常伴随显著昼夜温差) 之间的热力学差异, 维持酶在异源系统中的功能稳定性。卤虫 Elov17 的结构特性 (高  $\alpha$ -螺旋、跨膜域) 使其能在非原生条件下 (如低盐酵母系统) 依然保持高效的催化活性。

因此, 卤虫 Elov17 的高效催化活性并非偶然, 而是其在长期极端环境选择压力下, 通过独特的进化轨迹和精巧的结构优化形成的适应性特征, 确保其在严苛环境中仍能有效进行 LC-PUFA 生物合成, 从而维持生命活动。这一发现不仅为卤虫 LC-PUFA 合成网络提供了重要的酶学证据, 也为理解极端环境适应性提供了新的分子视角。

## 4 结论

通过分子克隆、生物信息学分析及酵母异源表达系统, 研究旧金山卤虫脂肪酸延长酶 Elov17 的结构与功能特性。本研究成功克隆了卤虫 *elov17* 基因的 ORF, 长度为 822 bp, 编码 273 个氨基酸, 氨基酸序列中包含保守区域, 但与其他物种存在较大差异, 揭示了其独特的进化地位。结构表征显示, 该酶具有高占比的  $\alpha$ -螺旋构象, 这种拓扑特征可以增强蛋白结构稳定性及底物结合效率, 进而提高其催化活性。功能分析结果表明, 相较于其他物种的 Elov1, 卤虫 Elov17 在脂肪酸延长方面表现出更强的催化活性, 这与其生存的低温和高盐等环境因素密切相关。卤虫 Elov17 的延长酶活性, 为卤虫 LC-PUFA 合成网络解析提供了关键酶学证据。卤虫 Elov17 的独特进化地位及其高效底物特异性, 为卤虫强化和功能性脂质开发提供了思路。

## 参考文献:

- [1] 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.
- [2] KUAH M K, JAYA RAM A, SHU CHIEN A C. The capacity for long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a carnivorous vertebrate: functional characterization and nutritional regulation of a *Fads2* fatty acyl desaturase with  $\Delta 4$  activity and an Elov15 elongase in *striped snakehead* (*Channa striata*) [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2015,

- 1851(3): 248-260.
- [3] CASTRO L F C, TOCHER D R. Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of *Fads* and *Elovl* gene repertoire [J]. *Progress in lipid research*, 2016, 62: 25-40.
- [4] TRIANTAPHYLIDIS G V, ABATZOPOULOS T J, SORGELOOS P. Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca) [J]. *Journal of biogeography*, 1998, 25(2): 213-226.
- [5] 邓洪刚, 解伟, 高美荣, 等. 西藏 4 个盐湖卤虫卵的生物学测定值、营养组成和孵化速率分析[J]. *天津科技大学学报*, 2023, 38(3): 22-28.
- [6] RAMOS-LLORENS M, RIBES-NAVARRO A, NAVARRO J C, et al. Can *Artemia franciscana* produce essential fatty acids? Unveiling the capacity of brine shrimp to biosynthesise long-chain polyunsaturated fatty acids[J]. *Aquaculture*, 2023, 563: 738869.
- [7] 曹亚辉, 胡泽超, 吉红, 等. 饲喂富硒酵母强化卤虫无节幼体对大口黑鲈仔鱼的生长, 成活率, 脂肪酸组成, 肝肠组织结构及抗逆性的影响[J]. *水产学报*, 2023, 47(10): 35-46.
- [8] 刘晓翠, 邓洪刚, 于学权, 等. 不同产地卤虫幼体对云石斑鱼幼苗生长和抗胁迫能力的影响[J]. *天津科技大学学报*, 2022, 37(2): 18-23.
- [9] 杜东东, 高美荣, 张波, 等. 哈萨克斯坦和俄罗斯主要盐湖卤虫卵生物学和营养学特性分析[J]. *天津科技大学学报*, 2020, 35(3): 57-62.
- [10] 邢明威, 邓洪刚, 高美荣, 等. 不同产地卤虫幼体对凡纳滨对虾仔虾生长、肌肉组分和抗胁迫能力的影响[J]. *中国水产科学*, 2022, 29(1): 70-78.
- [11] JAKOBSSON A, WESTERBERG R, JACOBSSON A. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism[J]. *Progress in lipid research*, 2006, 45(3): 237-249.
- [12] FERRAZ R B, PAIXÃO R V, LOPES-MARQUES M, et al. The repertoire of the elongation of very long-chain fatty acids (Elovl) protein family is conserved in tambaqui (*Colossoma macropomum*): gene expression profiles offer insights into the sexual differentiation process[J]. *Biochemistry and Molecular Biology*, 2022, 261: 110749.
- [13] LIU S, LI X, QI D, et al. Genome-wide characterization of the *Elovl* gene family in *Gymnocypris przewalskii* and their potential roles in adaptation to cold temperature[J]. *Biochemistry and molecular biology*, 2022, 262: 110759.
- [14] XIE Y, LI X, LIANG H, et al. Integrated multiomic profiling of tail adipose tissue highlights novel genes, lipids, and metabolites involved in tail fat deposition in sheep[J]. *BMC Genomics*, 2025, 26(1): 212.
- [15] WANG X, YU H, GAO R, et al. A comprehensive review of the family of very-long-chain fatty acid elongases: structure, function, and implications in physiology and pathology[J]. *European journal of medical research*, 2023, 28(1): 532.
- [16] RIBES-NAVARRO A, NAVARRO J C, HONTORIA F, et al. Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in marine gammarids: molecular cloning and functional characterisation of three fatty acyl elongases[J]. *Marine drugs*, 2021, 19(4): 226.
- [17] MAH M Q, KUAH M K, TING S Y, et al. Molecular cloning, phylogenetic analysis and functional characterization of an Elovl7-like elongase from a marine crustacean, the orange mud crab (*Scylla olivacea*) [J]. *Comparative biochemistry and physiology part b:biochemistry and molecular biology*, 2019, 232: 60-71.
- [18] 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.
- [19] ZHENG Q, LIU L, GUO X, et al. Fish ELOVL7a is involved in virus replication via lipid metabolic reprogramming[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2024, 149: 109530.
- [20] INOUE Y, KAMIYA T, HARA H. Increased expression of ELOVL7 contributes to production of inflammatory cytokines in THP-1 cell-derived M1-like macrophages[J]. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 2023, 72(3): 215.
- [21] WANG W M, YANG Z G, LIU C, et al. ELOVL fatty acid elongase 7 (ELOVL7), upregulated by Mdr2-knockout, predicts advanced liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B[J]. *European review for medical & pharmacological sciences*, 2023, 27(5): 1954-1970.
- [22] JIANG X, ZHONG R, DAI W, et al. Exploring diagnostic biomarkers and comorbid pathogenesis for osteoarthritis and metabolic syndrome via bioinformatics

- approach[J]. International journal of general medicine, 2021, 14: 6201-6213.
- [23] EROL C, BAWA T A, ÖZKAN Y. Re-analysis of non-small cell lung cancer and drug resistance microarray datasets with machine learning[J]. Cybernetics and systems, 2025, 56(1): 69-80.
- [24] SUN X, GUO H, ZHU K, et al. Feed type regulates the fatty acid profiles of golden pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus 1758)[J]. Journal of applied animal research, 2018, 46(1): 60-63.
- [25] DE VOS S, ROMBAUTS S, COUSSEMENT L, et al. The genome of the extremophile *Artemia* provides insight into strategies to cope with extreme environments[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 635.
- [26] 吴文韬. DMRT 蛋白家族在卤虫性别发育中的功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2023.
- [27] 陈苏. 卤虫卵黄蛋白原的分子特征及其在卤虫休眠过程中的功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [28] NIE L, PASCOAT C, PIKE A C W, et al. The structural basis of fatty acid elongation by the ELOVL elongases[J]. Nature structural & molecular biology, 2021, 28(6): 512-520.
- [29] RIGDEN D J. The histidine phosphatase superfamily: structure and function[J]. Biochemical journal, 2008, 409(2): 333-348.
- [30] XIAO J, WANG W X. Genome-wide identification and expression profile of *Elovl* genes in threadfin fish *Eleutheronema*[J]. Scientific reports, 2023, 13(1): 1080.
- [31] ROTERMAN I, BRYLINSKI M, POLITICELLI F, et al. Structure and function of trans-membrane proteins[J]. Frontiers in chemistry, 2024, 12: 1414079.
- [32] MAHON A B, ARORA P S. End-capped  $\alpha$ -helices as modulators of protein function[J]. Drug discovery today: technologies, 2012, 9(1): 57-62.
- [33] HUNG C L, KUO Y H, LEE S W, et al. Protein stability depends critically on the surface hydrogen-bonding network: a case study of Bid protein[J]. The journal of physical chemistry B, 2021, 125(30): 8373-8382.
- [34] TAKANO Y, KONDO H X, NAKAMURA H. Quantum chemical studies on hydrogen bonds in helical secondary structures[J]. Biophysical reviews, 2022, 14(6): 1369-1378.
- [35] SUN P, ZHOU Q, MONROIG Ó, et al. Cloning and functional characterization of an *elovl4-like* gene involved in the biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Biochemistry and molecular biology, 2020, 242: 110408.
- [36] YAN J, LIANG X, CUI Y, et al. Elov14 can effectively elongate C18 polyunsaturated fatty acids in loach *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2017, 495(4): 2637-2642.
- [37] 宋岭, 朱克诚, 郭华阳, 等. 卵形鲳鲹脂肪酸延长酶 (Elov14-like) 基因特征与功能研究[J]. 南方水产科学, 2019, 15(3): 76-86.
- [38] GAJARDO G M, BEARDMORE J A. The brine shrimp *Artemia*: adapted to critical life conditions[J]. Frontiers in physiology, 2012, 3: 185.
- [39] XIE W, DENG H, SONG M, et al. The effects of diet, salinity and temperature on HUFA accumulation in *Artemia*[J]. Aquaculture, 2024, 592: 741154.
- [40] 高美荣, 邓洪刚, 邢明威, 等. 单胞藻和破囊壶菌对卤虫幼体高密度短期营养强化条件和效果的探究[J]. 上海海洋大学学报, 2024, 33(2): 352-360.
- [41] LUPAS A N, BASSLER J, DUNIN-HORKAWICZ S. The structure and topology of  $\alpha$ -helical coiled coils[J]. Fibrous proteins: structures and mechanisms, 2017, 82: 95-129.
- [42] VIEILLE C, ZEIKUS G J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability[J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2001, 65(1): 1-43.
- [43] FELLER G, GERDAY C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation[J]. Nature reviews microbiology, 2003, 1(3): 200-208.