

吉富罗非鱼 *leptin* 基因的克隆及其表达

唐永凯^{①②③} 俞菊华^② 徐 跑^{②③*} 李建林^② 李红霞^②
夏正龙^③ 李创举^①

① 农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室 荆州 434000;

② 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室 无锡 214081;

③ 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081

摘要: Leptin 为肥胖基因编码产物,是脂肪细胞分泌的蛋白质类激素,在能量平衡、摄食行为调节方面起着重要作用。采用 RT-PCR 法分离出了吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) *leptin* 基因的部分序列,其 cDNA 长度为 364 bp,编码 96 个氨基酸。同源性分析显示:鱼类 *leptin* 保守性较低。吉富罗非鱼 *leptin* 氨基酸序列与斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 的相似性较高,为 80.6%,但与虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 等其他鱼的相似性非常低,均在 40% 以下。使用 real time PCR 法检测 *leptin* 在各种组织中的表达量,结果发现,*leptin* 在肝中相对表达量最为丰富,是肌肉中相对表达量的 3 000 倍,其次为性腺和脑,分别是肌肉中相对表达量的 1 250 倍和 450 倍,而肾、肠和肌肉中表达量较少。

关键词: 吉富罗非鱼; *leptin*; 克隆; 表达

中图分类号: S917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2012)03-89-06

Cloning and Expression of *leptin* in Genetically Improved Farmed Tilapia (GIFT)

TANG Yong-Kai^{①②③} YU Ju-Hua^② XU Pao^{②③*} LI Jian-Lin^② LI Hong-Xia^②
XIA Zheng-Long^③ LI Chuang-Ju^①

① Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation and Utilization, Ministry of Agriculture, Jingzhou 434000;

② Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Wuxi 214081;

③ Wuxi Fisheries College, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China

Abstract: Leptin, a product of the obese gene, is a multifunctional hormone secreted predominantly by adipocytes. It plays an important role in regulating energy balance and feeding behavior. Partial cDNA of *leptin* was isolated from genetically improved farmed tilapia (GIFT) (*Oreochromis niloticus*) through RT-PCR. The cDNA was 364 bp in length which encoded 96 amino acid residues. Homology analysis of the deduced amino acid sequence of fish *leptin* was carried out. Fish leptin showed a lower degree of homology. The deduced amino acid sequence of GIFT and *Epinephelus coioides leptin* was 80.6% identical, however the amino acids homology was below 40% when comparing GIFT with Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Medaka (*Oryzias latipes*),

基金项目 农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室第七期开放课题 (No. LFBU0706), 农业部公益性行业科研专项 (No. 200903046-2);

* 通讯作者, E-mail: xup@ffrc.cn;

第一作者介绍 唐永凯, 男, 助理研究员; 研究方向: 鱼类遗传育种; E-mail: tangyk@ffrc.cn。

收稿日期: 2011-10-28, 修回日期: 2012-03-02

Zebrafish (*Danio rerio*) and so on. *Leptin* expression in different tissues was detected by real time PCR. The highest relative expression level was found in liver, which was 3 000 times as high as in muscle; high expression was also found in gonad and brain, which were 1 250 times and 450 times as high as in muscle, respectively. However, the relative expression level was very low in kidney, intestine and muscle.

Key words: Tilapia; *leptin*; Cloning; Expression

Leptin 是 *obese* 基因编码的蛋白质,在哺乳类动物中主要由脂肪细胞分泌,通过血液循环透过血脑屏障,然后作用于下丘脑内的 *leptin* 受体,从而将外周信号反馈至中枢,对摄食、能量消耗、脂肪与葡萄糖的代谢进行调控。当体内脂肪含量增高时,脂肪细胞产生较高浓度的 *leptin* 作用于大脑,使其产生相关作用以停止摄食和提高代谢水平,使能量消耗超过食物吸收;反之,当脂肪含量降低时,*leptin* 浓度下降给大脑信号增强摄食和降低代谢水平,从而食物吸收超过能量支出,体重增加^[1-2]。Zhang 等利用定位克隆技术获得小鼠 (*Mus musculus*) 的 *obese* 基因,并将该基因定位于 6 号染色体上^[3]。哺乳类动物以及畜、禽的 *obese* 基因均由 3 个外显子和 2 个内含子组成,为单拷贝基因,保守性较高,但哺乳动物和非哺乳动物的 *leptin* 同源性较低^[4]。

在鱼类,Johnson 等^[5]首次通过鼠 *leptin* 抗体检测到蓝绿鳞鳃太阳鱼 (*Lepomis macrochirus*)、蓝鳃太阳鱼 (*L. cyanellus*)、大口黑鲈 (*Pomoxis annularis*)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的血液、脑、心、肝中均存在 *leptin*,但直到 2005 年,Kurokawa 等^[6]才首次报道河豚 (*Takifugu rubripes*) *leptin* 基因序列。随后,鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、绿色河豚鱼 (*Tetraodon nigroviridis*)、虹鳟、大西洋鲑 (*Salmo salar*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、蒙古红 (*Erythroculter mongolicus*) 等鱼类 *leptin* 研究陆续报道^[7-11]。鱼类 *leptin* 基因主要在脂肪和肝组织中表达,在心、脾、肌肉、脑、卵巢中表达量减少,在肾中微量表达,而在精巢和肠道组织中不表达,具有抑制摄食、控制体重的功

能^[8,12-13]。吉富罗非鱼 (genetically improved farmed tilapia, GIFT) (*Oreochromis niloticus*) 是通过家系选育获得的优良品系,且生长速度高于其他类养殖的罗非鱼,具有重要的经济价值^[14]。本研究旨在克隆出吉富罗非鱼的 *leptin* 基因,并确定其表达规律,为在分子水平探讨吉富罗非鱼肉质、生长发育的分子标记育种研究工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 吉富罗非鱼取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴实验基地。

1.1.2 试剂 Trizol Reagent 购自 Promega; *AMV*、*Taq* 酶、胶回收试剂盒、pUCm-T 载体、连接酶、sybgreen I 等购自宝生物工程(大连)有限公司,大肠杆菌 JM109 为本实验室保存。

1.1.3 仪器 PCR 仪为 Eppendorf Mastercycler personal。Real time PCR 仪为 MJ miniopticon。

1.1.4 引物 根据石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) *leptin* 的 cDNA 系列 (GenBank number: AB541026.1) 以及鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) *leptin* 的 cDNA 序列 (GenBank number: FJ588588.1) 设计一对引物,其序列为 P1:5'-GCA TAC ACA CAG ACA TCC AGC C-3'; P2:5'-GTC AAC TTG ACC TGG GAG ACT C-3'。根据获得的吉富罗非鱼 *leptin* 基因序列设计一对荧光定量 PCR 引物,其序列为 P3:5'-GCT GCA AGT TTT CAG TGT GGG TAC-3'; P4:5'-GAC CTG GAA CTC CTT GTT CAG CCT-3'。根据奥利亚罗非鱼 β -*actin* 序列 (GenBank number: EU784813) 设计一对荧光定量 PCR 引物,其序列为 P5:5'-CAC CAT GAA GAT CAA GAT TAT TG-3'; P6:5'-TAC TCC TGC TTG CTG ATC CA-3'。引物由上

海博尚生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的抽提 取吉富罗非鱼肝约 20 g, 按说明书用 Trizol 裂解法抽提总 RNA。

1.2.2 部分 cDNA 序列的分离 取 5 μg 从肝中抽提的总 RNA, 以 OligodT-AP[5'-CTG ATC TAG AGG TAC CGG ATC C(T)₁₆-3'] 为引物, 根据 AMV 使用说明进行 RT 反应, 然后用 10% 的 RT 液, 使用引物 P1 和 P2 扩增 *leptin* 400 bp 左右的序列。PCR 反应体系为 25 μl , 其中含 2.5 μl 10 \times buffer, 2 $\mu\text{mol/L}$ MgCl₂, 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 引物各 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 0.125 U *Taq* 酶。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 然后 30 个循环, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 PCR 产物的连接与转化 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 切下琼脂糖胶上目的条带, 用胶回收试剂盒纯化 PCR 产物, 连接产物转化到大肠杆菌 JM109 的感受态细胞后, 涂布于含 IPIG 和 X-Gal 的 LB 固体培养基 (AMP⁺)。挑白斑, 抽提质粒。经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定。

1.2.4 测序和序列分析 PCR 产物克隆到 pUCm-T 载体后, 送上海博尚生物技术有限公司测序。用 Dnastar、Clustal W 软件分析吉富罗非鱼 *leptin* 序列。

1.2.5 Real time PCR 用 500 ng 总 RNA, 以 OligodT-AP 为引物, 根据 AMV 使用说明进行 RT 反应, 反应总体积为 10 μl , 然后以此 RT 液为模板, 用 sybgreen I 进行 Real time PCR。反应条件为, 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 然后 40 循环, 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 20 s; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。为检验反应的特异性, 扩增产物用 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。对取得的数据用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法^[15] 进行分析。

2 结果

2.1 吉富罗非鱼 *leptin* 的分离 取吉富罗非鱼肝的总 RNA, 进行 RT-PCR, 用引物 P1 和 P2 扩增得到 400 bp 左右的条带 (图 1), 经克隆后

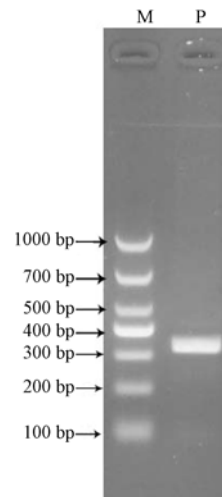


图 1 PCR 扩增产物

Fig. 1 The results of PCR amplification

M: DL1000 DNA 分子量标准; P: 扩增条带。

M: DL1000 DNA marker; P: Product of amplification.

测序, 得到 364 bp 片段。

2.2 序列拼接与分析 将吉富罗非鱼 *leptin* 的 cDNA 序列提交到 GenBank, 登陆号为 JN688249。其中 cDNA 编码 96 个氨基酸, 含疏水氨基酸 39 个, 极性氨基酸 24 个, 酸性氨基酸 7 个, 碱性氨基酸 8 个 (图 2)。

选取 GenBank 中已登录的一些鱼类的 *leptin* 氨基酸序列: 虹鳟 (BAG09232)、草鱼 (ACF23048)、红鳍东方鲀 (*Fugu rubripes*, BAD94444)、鲤鱼 (CAH33828.3)、青鳉 (*leptin-A*: BAD94448, *leptin-B*: BAH24202)、斑马鱼 (*leptin-A*: CAQ14856.1, *leptin-B*: CAP15930.1)、鲫鱼 (*Carassius auratus*, ACL68083.1)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*, BAI66433)。选择与吉富罗非鱼 *leptin* 氨基酸序列相似的区域, 使用 Dnastar 软件包中的 MegAlign 软件对 *leptin* 氨基酸序列进行比对, 结果显示这段氨基酸序列保守性非常低, 不适合做系统进化树。序列相似性比较结果显示, 吉富罗非鱼 *leptin* 氨基酸序列与斜带石斑鱼的相似性较高, 为 80.6%, 与其他鱼的相似性非常低, 均在 40% 以下。*Leptin* 同源基因之间的相似性也非常低, 如斑马鱼 *leptin-A* 和 *leptin-B* 的相似性为 20.9%,

```

1 GC ATA CAC ACA GAC ATC CAG CCA AGG AAA TAA TCT CAC TTA GTC TCA TCT ATT ACA CAC 59
60 TGG CCT TAC TAG AAA ATG AGC TAC ACT AAT GCA CTG TTG TCT TCC CTG CTG CAA GTT TTC 119
1 M S Y T N A L L S S L L Q V F 15
120 AGT GTG GGT ACG GCT GCT CCT CTG CCT CCG GAA GTA GTA AAG ATG AAA TCA AAA GCG AAG 179
16 S V G T A A P L P P E V V K M K S K A K 35
180 TGC ATC GCT GAG CAT CTG GAC GTG AGG CTG AAC AAG GAG TTC CAG GTC CCT CCT GGA CTT 239
36 W I A E H L D V R L N K E F Q V P P G L 55
240 ACA CAC AGT CCG CTT GCC GAC ATG CTG GAG GGA CCG TCG TCC ATA GTC ACG GTC TGC TTG 299
56 T H S P L A D M L E G P S S I V T V C L 75
300 GAT GGT TAG AAA CTT CCC ATC CAT ATC TCC GTC ACC GTC AAT GGA GTC TCC CAG GTC AAG 359
76 D G Y K L P I L I S V T V N G V S Q V K 95
360 TTG AC 364
96 L 96
    
```

图 2 吉富罗非鱼 *leptin* 基因及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 The deduced amino acid sequences of *leptin* gene in *Oreochromis niloticus*

		相似百分比 Percent identity (%)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
差异性 Divergence	1	■	27.5	21.3	36.7	21.7	36.6	16.5	19.8	19.1	21.7	80.6	1 吉富罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>
	2	177.5	■	28.7	25.0	32.9	22.4	21.7	29.0	25.0	30.5	29.3	2 虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>
	3	231.0	168.3	■	20.7	73.7	21.3	22.6	60.2	27.1	74.9	21.1	3 草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>
	4	125.0	195.0	238.0	■	23.0	30.7	25.3	19.7	18.6	23.6	42.4	4 红鳍东方鲀 <i>Fugu rubripes</i>
	5	226.0	143.0	32.4	213.0	■	21.6	20.1	64.5	27.7	85.4	21.5	5 鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>
	6	125.5	219.0	231.0	155.8	228.0	■	16.4	21.1	18.7	23.5	41.1	6 青鳉 <i>Oryzias latipes leptin-A</i>
	7	299.0	226.0	217.0	195.3	244.0	299.0	■	20.9	27.2	21.4	18.5	7 青鳉 <i>Oryzias latipes leptin-B</i>
	8	249.0	166.4	56.1	249.0	47.9	233.0	234.0	■	26.1	65.1	21.7	8 斑马鱼 <i>Danio rerio leptin-A</i>
	9	257.0	195.0	180.4	264.0	175.4	264.0	179.9	188.2	■	28.4	17.8	9 斑马鱼 <i>Danio rerio leptin-B</i>
	10	226.0	156.6	30.7	207.0	16.3	208.0	229.0	46.8	170.8	■	23.7	10 鲫鱼 <i>Carassius auratus</i>
	11	22.4	164.2	233.0	102.9	228.0	107.6	267.0	226.0	277.0	207.0	■	11 斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		

图 3 序列相似性分析

Fig. 3 The comparison analysis of sequence similarity

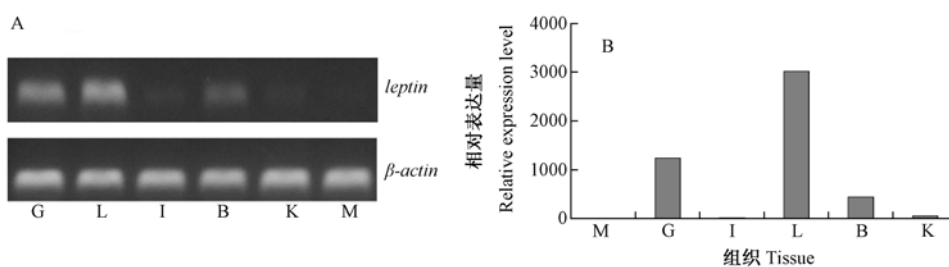


图 4 *Leptin* 在各组织中的表达

Fig. 4 *Leptin* expression in different tissues

A: 电泳图; B: 相对表达量。A: Electrophoretogram; B: Relative expression level.

G: 性腺; L: 肝; I: 肠; B: 脑; K: 肾; M: 肌肉。G: Gonad; L: Liver; I: Intestine; B: Brain; K: Kidney; M: Muscle.

青鳉 *leptin-A* 和 *leptin-B* 的相似性为 16.4%。而鲤科鱼类之间 *leptin* 的相似性较高,如鲫鱼和鲤鱼之间的相似性为 85.4%,和草鱼之间的相似性为 74.9% (图 3)。

2.3 *Leptin* 的表达分析 取吉富罗非鱼肌肉、性腺、肠、肝、脑、肾的 RNA,反转录为 RT,以此 RT 液为模板进行 real time PCR。结果显示, *leptin* 在肌肉、性腺、肠、肝、脑、肾中均有表达 (图 4A)。以 β -actin 为内参基因,根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算 *leptin* 在各组织中的相对表达量,定义肌肉中 *leptin* 的表达量为 1,那么 *leptin* 在肝中表达量最为丰富,是肌肉中表达量的 3 000 倍,其次为性腺和脑,而肾、肠、肌肉中表达量较少 (图 4B)。

3 讨 论

本研究克隆了吉富罗非鱼 *leptin* 基因,序列相似性比较显示, *leptin* 只在同科、同目的鱼类之间有一定的保守性,相对于管家基因 β -actin 来讲^[16],其基因保守性较低。同为鲈形目的吉富罗非鱼和斜带石斑鱼 *leptin* 氨基酸的相似性为 80.6%,鲤科鱼类的鲫鱼和鲤鱼之间的相似性为 85.4%,而吉富罗非鱼和鲫鱼、鲤鱼之间的相似性均为 21.7%。*Leptin* 保守性较低的这一现象在其他研究中也得到了印证, Li 等^[17]发现,草鱼 *leptin* 氨基酸序列与鲢鱼、鲤鱼、斑马鱼相似性分别为 87.9%、73.4%、57.2%,但与红鳍东方鲀、虹鳟、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、小鼠、人 (*Homo sapiens*) 的相似性分别为 20%、28.85%、28.7%、23.23%。Murashita 等^[8]发现,虹鳟 *leptin* 氨基酸序列与大西洋鲑的相似性为 98.7%,但与鲤鱼、红鳍东方鲀、非洲爪蟾、蝶螈 (*Cynops orientalis*)、人的相似性在 20.8%~26.8%。另外, Kurokawa 等在青鳉^[18]、Gorissen 等^[19]在斑马鱼中分别克隆出 2 个同源 *leptin* 基因,其序列相似性也较低,这表明在吉富罗非鱼中可能存在另外一个 *leptin* 旁系同源基因。尽管 *leptin* 氨基酸序列的相似性较低,但其四级结构以及基因结构却相当保守^[7,18-19]。

Real time PCR 显示 *leptin* 在吉富罗非鱼组织中表达范围较广,不仅在肝中大量表达,而且还在性腺、脑、肌肉、肠、肾中也有所表达。这一结果与 *leptin* 基因在人、猪 (*Sus domestica*) 中的研究有不同之处。在人的各器官中进行 *leptin* mRNA 检测,结果只有在大网膜、后腹膜、肠系膜及皮下脂肪组织中可见,尤以皮下脂肪组织最多^[20];在猪的脂肪、肝、心、肾、肌肉组织中均检测到 *leptin* 基因的表达,但脂肪组织中表达量较高,其他组织只是微量表达^[21]。吉富罗非鱼的肝中检测到 *leptin* 基因的大量表达,这与 *leptin* 在鲤鱼、虹鳟、青鳉、斑马鱼的研究相同,肝是 *leptin* 的主要表达组织^[7-8,18-19],这表明肝可能是 *leptin* 的主要合成场所。*Leptin* 的广泛分布,决定了 *leptin* 具有广泛的生物学功能。本文克隆了吉富罗非鱼 *leptin* 基因,并研究了其表达,为进一步开展 *leptin* 的功能和应用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Ahima R S, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. Role of *Leptin* in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 1996, 382(6588): 250-252.
- [2] Tang B L. *Leptin* as a neuroprotective agent. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 368(2): 181-185.
- [3] Zhang Y Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature*, 1994, 372(6505): 425-432.
- [4] Boswell T, Dunn I C, Wilson P W, et al. Identification of a non-mammalian *leptin*-like gene: characterization and expression in the tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*). *Gen Comp Endocrinol*, 2006, 146(2): 157-166.
- [5] Kurokawa T, Uji S, Suzuki T. Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian *leptin* from pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Peptides*, 2005, 26(5): 745-750.
- [6] Johnson R M, Johnson T M, Londraville R L. Evidence for *leptin* expression in fishes. *J Exp Zool*, 2000, 286(7): 718-724.
- [7] Huising M O, Geven E J W, Kruiswijk C P, et al. Increased *leptin* expression in Common Carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation. *Endocrinology*, 2006, 147(12): 5786-5797.
- [8] Murashita K, Uji S, Yamamoto T, et al. Production of

- recombinant *leptin* and its effects on food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2008, 150(4): 377–384.
- [9] 戴汉川, 伍晓雄, 聂芬, 等. 草鱼 *Leptin* 基因的分选鉴定及在巴斯德毕赤酵母中的表达. *农业生物技术学报*, 2006, 14(5): 677–682.
- [10] 潘庭双, 龙良启, 吴小平, 等. 蒙古红鲌肥胖基因 cDNA 的克隆与组织表达特异性研究. *水生生物学报*, 2007, 31(1): 94–98.
- [11] 郁颖, 梁旭方, 李观贵, 等. 草鱼与鲢鱼肥胖基因克隆与序列分析. *动物学研究*, 2009, 30(5): 480–486.
- [12] De Pedro N, Martínez-álvarez R, Delgado M J. Acute and chronic leptin reduces food intake and body weight in goldfish (*Carassius auratus*). *J Endocrinol*, 2006, 188(3): 513–520.
- [13] Volkoff H, Eykelbosh A J, Peter R E. Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. *Brain Res*, 2003, 962(1/2): 90–109.
- [14] 董在杰, 何杰, 朱健, 等. 60 个家系吉富品系罗非鱼初期阶段的生长比较. *淡水渔业*, 2008, 38(3): 32–34.
- [15] Kenneth J L, Thomas D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [16] 胡海彦, 贾永义, 唐永凯. 奥利亚罗非鱼 β -actin 基因的克隆与结构分析. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(2): 185–190.
- [17] Li G G, Liang X F, Xie Q L, et al. Gene structure, recombinant expression and functional characterization of grass carp leptin. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 166(1): 117–127.
- [18] Kurokawa T, Murashita T. Genomic characterization of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(2): 229–237.
- [19] Gorissen M, Bernier N J, Nabuurs S B, et al. Two divergent leptin paralogues in zebrafish (*Danio rerio*) that originate early in teleostean evolution. *J Endocrinol*, 2009, 201(3): 329–339.
- [20] Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, et al. Human obese gene expression: adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes*, 1995, 44(7): 855–858.
- [21] 戴茹娟, 李宁, 吴常信. 猪肥胖基因 cDNA 的克隆与分析. *遗传学报*, 2000, 27(4): 290–296.