

## 鲤肠道 *sgt1* 基因的表达与抗体制备

聂国兴\*, 王 贝, 闫 潇, 侯彩霞, 张建新, 张新胜, 郑俊林, 王俊丽  
(河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007)

**摘要:** 钠/葡萄糖共转运载体 1 (sodium/glucose cotransporter 1, Sglt1) 是协助葡萄糖吸收的主要蛋白。实验首先采用 RT-PCR 获取 *sgt1* 基因全长, 克隆至 PGME-T 载体进行序列及免疫原性分析, 选择长度为 92 个氨基酸 (544~637) 的多肽作为目的片段 (*sgt1*-P), 扩增 *sgt1*-P, 引入双酶切位点 *EcoR* I 和 *Hind* III 后, 连接至 pET-32a(+) 上, 构建表达载体 pET-32a(+)-*sgt1*-P, 转化至 *E. coli* Rosetta 中, 获得重组基因工程菌, 通过 IPTG 诱导表达, 获得目标多肽, 并以此为抗原制备 Sglt1 特异性抗体。SDS-PAGE 电泳分析表明, 目标多肽分子量约为 30 ku。采用耳缘静脉结合皮下注射, 免疫新西兰长耳兔, 免疫总时长为 38 d。制备了鲤 Sglt1 抗体, ELISA 测得效价为  $1:10^5$ ; 免疫组化结果表明, 抗体具有较高亲和力和特异性, 可以应用于鲤 Sglt1 的表达定位研究。该抗体的获得为鲤肠道 Sglt1 表达及转运活性的系统研究奠定了基础, 同时, 获取的 Sglt1 抗体亦可用于其它鱼类 Sglt1 转运蛋白表达定位和定量研究。

**关键词:** 鲤; 钠/葡萄糖共转运载体 1; 原核表达; ELISA; 抗体效价

**中图分类号:** S 917; Q 789

**文献标志码:** A

糖是动物生命活动必不可少的营养素, 动物对糖的利用离不开转运载体。研究表明, 动物通过肠粘膜吸收的单糖主要是葡萄糖、半乳糖和果糖, 其中葡萄糖占 80%。因此, 葡萄糖的吸收在动物生产中有着非常重要的作用。研究证实, 肠上皮细胞刷状缘膜上的钠/葡萄糖共转运载体 1 (sodium/glucose cotransporter 1, Sglt1) 是协助葡萄糖吸收的主要蛋白, 在动物的生命活动中具有重要意义<sup>[1-3]</sup>。

Sglt1 是 SSF 家族成员<sup>[4-5]</sup>, 主要在小肠上皮刷状缘及肾脏近曲小管表达。在小肠上皮细胞中表达丰度较高<sup>[6-7]</sup>, 在肾脏中表达丰度稍低<sup>[8]</sup>, 在腮腺、颌下腺、唾液腺、甚至心脏中也有少量表达<sup>[9-11]</sup>。

Sglt1 作为葡萄糖转运的主要载体, 主要负责小肠粘膜上皮细胞 BBM 侧的葡萄糖吸收与转运<sup>[12]</sup>。鱼类肠道对葡萄糖的吸收与高等动物相似, 主要经 Sglt1 运输进小肠。Sglt1 作为钠依赖的

转运载体, 葡萄糖与钠协同转运<sup>[13]</sup>, 结合 1 mol 葡萄糖和 2 mol 钠离子, 形成  $\text{Na}^+$ -载体-葡萄糖复合物, 顺  $\text{Na}^+$  浓度梯度进入细胞<sup>[14-15]</sup>, 随后由位于基底膜的 Glut2 将葡萄糖协助转运至血液<sup>[16]</sup>。

关于 *sgt1* 基因组成、分子结构及家族成员研究较多<sup>[17-20]</sup>, 而对其转运活性的调控因素及调控机理研究较少, 现有报道多集中在哺乳类和禽类。目前, 鱼类利用糖类的相关研究已引起国内外学者的广泛关注。本研究以鲤 (*Cyprinus carpio*) 研究对象, 拟在已经获得的鲤肠道 *sgt1* 基因 cDNA 全长的基础上<sup>[21]</sup>, 表达 Sglt1 载体蛋白, 以其为抗原制备 Sglt1 特异性抗体, 为从分子水平研究鱼类肠道葡萄糖的代谢奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**实验材料** 实验用鱼为鲤, 免疫动物选用新西兰长耳兔 (约 3 kg)。

收稿日期: 2011-11-07 修回日期: 2011-12-09

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30972252); 河南省高校科技创新杰出人才项目 (2010HASTIT020); 河南省重点科技攻关项目 (112102210106, 112102310321)

通讯作者: 聂国兴, E-mail: niegx@htu.cn

试剂 AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒, UNIQ-10 柱式通用 DNA 纯化试剂盒等购自生工生物工程(上海)有限公司; plus DNA 聚合酶, *EcoR* I, *Hind* III 和 Protein MW Marker(Low) 等购自大连宝生物公司; Plasmid Mini Kit I 购自 OMEGA 公司; Goat anti-Rabbit IgG (HRP conjugated) 和丙酮酰胺等购自鼎国生物技术有限责任公司;  $T_4$  DNA 连接酶购自美国 Fermentas 公司; 完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂等购自德国 SIGMA 公司; 其他生化试剂均为国产分析纯。PCR 扩增引物合成由生工生物工程(上海)有限公司完成, 序列测定由中美泰和生物技术(北京)有限公司完成。

仪器 PCR 仪购自 Biometra 公司, DNA 序列分析使用 DNAMAN 软件, 酶标测定仪和微孔板恒温振荡器购自 Thermo 公司。

质粒与菌株 PGEM-T Vector 购自 PROMEGA 公司, pMD<sup>TM</sup> 19-T Vector 购自 TaKaRa 公司; 受体菌 JM-109、Rosetta 和表达质粒 pET-32a(+) Vector 本实验室保存。

## 1.2 PCR 引物设计及 RT-PCR

利用 Primer Premier 5.0 设计两对引物, 基于本实验室已获得的鲤肠道 *sgl1* 基因的全长序列, 设计一对特异性引物 *sgl1*-F 和 *sgl1*-R:

*sgl1*-F: 5'-ATGGGTGAAGAATATTTTGG-3'  
*sgl1*-R: 5'-TTAGCCAAAGAAACCATGG-3'

另一对为含 *EcoR* I 及 *Hind* III 双酶切位点的特异性引物 *sgl1*-F2 和 *sgl1*-G2:

*sgl1*-F2: 5'-GGAATTCAAACCCATTGACG-ACAAA-3'

*sgl1*-G2: 5'-CCCAAGCTTGTCTCCATA-GCGGT-3'

划线部分分别为 *EcoR* I 及 *Hind* III 的酶切位点。

采用 Trizol 法提取鲤前肠组织总 RNA, 用 Oligo(dT)<sub>18</sub> 引物进行反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 采用 *sgl1*-F 和 *sgl1*-R 引物进行 PCR 扩增, 反应条件为 95 °C 3 min, 94 °C 50 s, 52.4 °C 50 s, 72 °C 2 min 10 s, 30 个循环, 72 °C 10 min, 14 °C 保存。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

## 1.3 PCR 产物的克隆、鉴定以及重组质粒 pMD<sup>TM</sup>19-T-*sgl1*-P 的构建

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后用凝胶

回收试剂盒回收, 将回收产物与 pGEM-T 载体连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌 JM109, 随机挑取细菌, 进行菌液 PCR 验证, 将阳性克隆的菌液进行测序。

采用 *sgl1*-F2 和 *sgl1*-G2 引物, 以 pGEM-T-*sgl1* 质粒为模板进行 PCR 扩增, 引入 *EcoR* I 及 *Hind* III 双酶切位点, 反应条件为 95 °C 3 min, 94 °C 50 s, 52.4 °C 50 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 10 min, 14 °C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后用凝胶回收试剂盒回收, 将回收产物与 pMD<sup>TM</sup>19-T 载体连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌 JM109, 选取阳性克隆菌株扩大培养, 用 Plasmid Mini Kit I 质粒提取试剂盒提取 pMD<sup>TM</sup>19-T-*sgl1*-P 质粒。

## 1.4 原核表达载体 pET-32a(+)-*sgl1*-P 的构建、鉴定

将阳性克隆 pMD<sup>TM</sup>19-T-*sgl1*-P 与原核表达质粒 pET-32a(+) 分别用 *EcoR* I、*Hind* III, 37 °C 双酶切, 用凝胶回收试剂盒回收 *sgl1*-P 片段和线性化 pET-32a(+) 质粒, 按照  $T_4$  DNA 连接酶的说明书设计连接反应体系, 构建表达质粒 pET-32a(+)-*sgl1*-P, 并转化 *E. coli* Rosetta, 筛选阳性克隆, 进行单双酶切鉴定。

## 1.5 目的基因的诱导表达及鉴定

将构建的基因工程菌按 1% 接种量接种于新鲜的含有 AMP 的 TB 培养液中, 37 °C, 200 r/min 振荡培养至菌液 OD<sub>600</sub> 达到 0.5 ~ 0.6, 加入 IPTG (终浓度 1 mmol/L), 37 °C, 200 r/min 振荡诱导培养 8 ~ 10 h。诱导表达后的菌液 5 000 r/min 离心 3 min 得到菌体, 弃上清, 加适量 ddH<sub>2</sub>O, 与 2 × SDS-PAGE 上样缓冲液 1:1 在 1.5 mL Eppendorf 管中混合。沸水浴 10 min, 5 000 r/min 离心 30 s。取 35 μL 样品进行 SDS-PAGE 电泳分析, 以未经 IPTG 诱导的对照菌体样品和诱导的含有空载体 pET-32a(+) 表达菌体为对照。

## 1.6 融合蛋白的获得、纯化

将诱导表达的菌液离心, 弃上清, 按照 1 g 菌体(湿重)加 6 mL 蒸馏水, 吹打混匀, 再加等体积的 2 × SDS-PAGE 上样缓冲液, 混匀, 沸水浴 10 min, 使蛋白变性。进行 SDS-PAGE, 电泳结束后将分离胶放入 0.3 mol/L KCl 染色, 显示目的条带。切下胶上的目的蛋白条带, 放入 ddH<sub>2</sub>O 清洗。将胶条剪碎放入塑料培养皿中, 冷冻干燥(1 d), 放入研钵中磨成粉末, 每 200 毫克目的蛋

白粉加 3 mL 生理盐水溶解蛋白,离心,取上清,用微量分光光度计检测蛋白浓度。

### 1.7 表达产物抗血清的制备以及抗血清效价的测定

将回收的蛋白用生理盐水稀释成一定的浓度,采用耳缘静脉(约含 300  $\mu\text{g}$  抗原)结合皮内注射法(约含 200  $\mu\text{g}$  抗原)免疫兔子,每隔 10 天加强免疫一次。第 4 次免疫后 8 d 颈动脉采血(兔子在采血前禁食 1 d)。采集血样收集于经灭菌并不含抗凝剂的离心管中,室温放置 2 h,待血液凝块后,放 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,使之凝固,析出淡黄色抗血清,将抗血清转移至另一管中,血凝块以 1 500 r/min 离心 10 min,吸出上清液合并于收集到的抗血清管中,分装冷冻干燥保存,部分放于 4  $^{\circ}\text{C}$  备用。

采用酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA):将抗原(纯化过的 Sgl1 融合蛋白)稀释于包被缓冲液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6)中,终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,每孔加 100  $\mu\text{L}$ ,并设立空白对照(只加包被缓冲液),4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜后,用 1  $\times$  PBST [1  $\times$  PBS + (0.05%) Tween 20],于室温下洗涤 3 次,每次 3 min,然后每孔加 100  $\mu\text{L}$  封闭液(0.5% BSA),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h,1  $\times$  PBST 洗涤 3 次,加入一抗,血清样品按  $10^2 \sim 10^9$  倍比稀释于 1  $\times$  PBST 中,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h,1  $\times$  PBST 洗涤 3 次,加入酶标二抗,酶标二抗按说明书,1:1 000 稀释于 1  $\times$  PBST 中,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$ ,1 h,1  $\times$  PBST 洗涤 3 次,每孔加 100  $\mu\text{L}$  显色液(TMB 溶液),室温放置 10 ~ 15 min,加入 50  $\mu\text{L}$ ,2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止,酶标仪上判读结果。

### 1.8 Sgl1 抗体的免疫组化检测

采用石蜡包埋法包埋鲤的前肠,进行石蜡切片,片厚 5  $\mu\text{m}$ ,1% 的蛋清展片,进行脱蜡复水,免疫组织化学染色,苏木精伊红复染,脱水透明及树脂封片。免疫组织化学染色的步骤:内源性过氧化物酶阻断、羊血清封闭、一抗孵育、二抗孵育、DAB 显色、终止。

## 2 结果

### 2.1 免疫原性在线分析

根据鲤肠道 *sgt1* PCR 扩增片段的测序结果,用 BepiPred 1.0 在线服务器预测抗原表位,通过分析,得知 Sgl1 蛋白的 546 ~ 637 氨基酸免疫原

性较高,可作为原核表达的目的片段,采用 Primer Premier 5.0 引物设计软件,以 *sgt1* 全长基因为模板,设计一对含 *EcoR* I 及 *Hind* III 酶切位点的引物 *sgt1*-F2 和 *sgt1*-G2 来扩增含有抗原决定簇的目的片段 *sgt1*-P(276 bp)。

### 2.2 克隆 *sgt1* 基因的 ORF

以鲤前肠提取的总 RNA 作反转录模板,经 RT-PCR 获得了 *sgt1* 全长的目的片段,1% 琼脂糖凝胶电泳表明,扩增到了大约 2 000 bp 的 DNA 片段(图 1),对获得的阳性克隆 *sgt1*-pGEM-T Vector 进行序列测定,结果表明,该核酸片段长度为 1 977 bp,经序列比对显示,该 DNA 片段即为鲤肠道 *sgt1* 的 ORF 区。

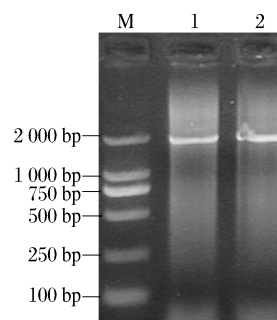


图 1 鲤 *sgt1* PCR 扩增产物的电泳分析

M. 2 000 bp DNA Marker; 1 ~ 2. PCR 产物。

Fig. 1 Gel electrophoresis analysis of PCR product

M. 2 000 bp DNA Marker; Lane 1 ~ 2. *sgt1* PCR product.

### 2.3 扩增抗原决定簇片段

用获得的 *sgt1* 全长 DNA 片段为模板,以 *sgt1*-F2 和 *sgt1*-G2 为引物进行 PCR 扩增,在 250 bp 附近获得一条特异性条带(*sgt1*-P, 实际大小为 276 bp)(图 2)。

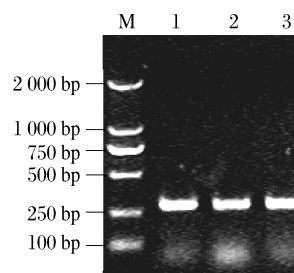


图 2 鲤 *sgt1* 抗原决定簇区域 PCR 扩增产物的电泳分析

M. 2 000 bp DNA Marker; 1 ~ 3. *sgt1* 抗原决定簇区域 PCR product.

Fig. 2 Gel electrophoresis analysis of PCR product

M. 2 000 bp DNA Marker; Lane 1 ~ 3. *sgt1* epitope region PCR product.

## 2.4 构建表达载体 pET-32a(+)-*sglt1*-P 并进行酶切验证

根据 *sglt1* ORF 序列设计引物 *sglt1*-F2、*sglt1*-G2, 引物限制性酶切位点 *EcoR* I 和 *Hind* III。PCR 产物纯化后, 与 pMD<sup>TM</sup>19-T Vector 连接, 提取质粒, 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 并与相同酶酶切的载体 pET-32a(+) 相连接, 得到重组表达质粒 pET-32a(+)-*sglt1*-P。对筛选到的阳性克隆 pET-32a(+)-*sglt1*-P 进行 *EcoR* I 单酶切及 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切(图 3), 1% 琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果。1 号泳道为单酶切结果, 位于 6 000 bp 附近有一条清晰的条带, 2 号泳道为双酶切结果, 可以观察到在约 6 000 bp 附近和 500 bp 下游有两条电泳带, 分别与 pET-32a(+) 和 *sglt1*-P 目的片段长度相同, 可知 pET-32a(+)-*sglt1*-P 为阳性重组表达质粒。

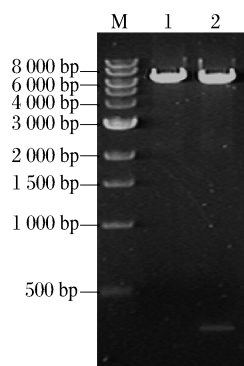


图 3 重组表达质粒 pET-32a(+)-*sglt1* (276 bp) 的电泳图谱

M. 1 kb DNA ladder; 1. pET-32a(+)-*sglt1*-P(276 bp) 单酶切电泳图谱; 2. pET-32a(+)-*sglt1* (276 bp) 双酶切电泳图谱。

Fig. 3 Electrophoresis pattern of recombinant plasmid pET-32a(+)-*sglt1*-P(276 bp)

M. 1 kb DNA ladder; 1. electrophoresis pattern of pET-32a(+)-*sglt1*-P(276 bp) single digest; 2. electrophoresis pattern of pET-32a(+)-*sglt1* (276 bp) double digests.

## 2.5 融合蛋白的表达及鉴定

以含空质粒 pET-32a(+) 的菌液和无 IPTG 诱导的 pET-32a(+)-*sglt1*-P 菌液做阴性对照, 用 IPTG 对 pET-32a(+)-*sglt1* 重组表达载体在大肠杆菌 Rosetta 中诱导表达, SDS-PAGE 显示 1 条特异性表达条带, 大小约 30 ku(图 4), 而阴性对照组在此位置没有特异性条带。

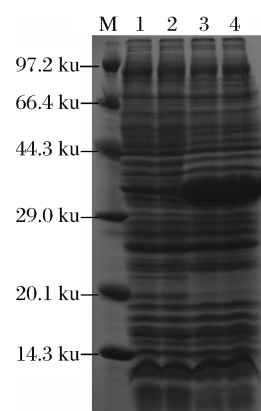


图 4 重组 *sglt1* SDS-PAGE 电泳分析

M. 低分子量蛋白 Marker; 1. pET-32a(+) 转化 *E. coli* Rosetta 对照组; 2. 表达组没有 IPTG 诱导; 3~4. 表达组有 IPTG 诱导。

Fig. 4 SDS-PAGE analysis for the recombinant *sglt1*  
M. Protein molecular weight marker (low); 1. *E. coli* Rosetta with pET-32a(+) as a control; 2. expressed protein in *E. coli* Rosetta without IPTG inducement; 3-4. expressed protein in *E. coli* Rosetta inducement by IPTG.

## 2.6 Sglt1 抗血清效价测定结果

抗血清效价测定结果见表 1。A、B、C 分别是不同稀释倍数抗血清(序号 1~8)的 3 个平行试验; D 为正常兔子的血清; F 是没有包被抗原的阴性对照。通过酶标仪测定 Sglt1 抗血清 OD<sub>450</sub> 值, 采用终点“滴度”表示法判断结果, Sglt1 抗血清的效价为 1:10<sup>5</sup>。

表 1 ELISA 测定抗体效价

Tab. 1 Determination of antibody titer by ELISA

	稀释倍数 dilution							
	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0.910 0	1.032 0	0.847 3	0.617 3	0.202 1	0.107 7	0.107 5	0.088 7
B	0.912 0	1.041 3	0.857 0	0.625 8	0.202 2	0.109 9	0.107 5	0.088 6
C	0.926 6	0.995 7	0.854 3	0.619 6	0.199 1	0.108 9	0.107 3	0.088 6
D	0.141 5	0.092 5	0.079 5	0.076 2	0.081 3	0.076 9	0.074 8	0.076 0
F	0.080 3	0.080 2						

### 2.7 Sgl1 的应用效果

研究表明,Sgl1 主要在小肠绒毛刷状缘细胞中表达。免疫组织化学方法鉴定,以辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 为二抗进行染色,显微

镜下观察 Sgl1 抗体在鲤前肠中的结合情况(图 5)。Sgl1 主要定位于前肠刷状缘上,图 5-a 中可见刷状缘呈现明显的棕黄色阳性染色条带,显著区别于阴性对照(图 5-b)。

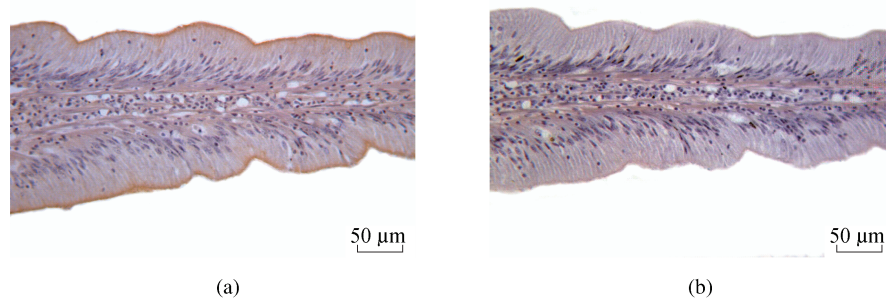


图 5 鲤前肠 Sgl1 表达的免疫组织化学检测结果

(a) 阳性染色; (b) 阴性染色。

Fig. 5 Immunohistochemistry detection of Sgl1 in foregut of *C. carpio*

(a) positive staining of foregut; (b) negative control staining of foregut by omitting primary.

### 3 讨论

葡萄糖转运载体(葡萄糖共转运载体和葡萄糖逆转运载体)在膜转运系统中占据重要位置,肠上皮细胞刷状缘上的 Sgl1 负责吸收肠腔内的葡萄糖和半乳糖,此转运过程是动物利用糖的决定性步骤。研究表明,Sgl1 的突变会引发葡萄糖半乳糖吸收障碍疾病(glucose-galactose malabsorption, GGM)<sup>[22]</sup>,其基因调控、表达、蛋白合成、修饰等出现异常都会引起 Sgl1 蛋白数量和功能的异常,导致机体出现相应的病理变化,因此 Sgl1 在动物的生命活动中具有重要意义。鱼类肠道对葡萄糖的吸收与高等动物相似,主要经 Sgl1 运输进小肠。而鱼类对糖的利用能力较哺乳类动物差,限制了饲料中糖类的利用。因此对鱼类 Sgl1 机理的研究显得尤为重要。本研究采用原核表达系统获得具有免疫原性的 Sgl1 融合蛋白,以其为基础制备了 Sgl1 的抗体,该抗体为开展鲤其他器官中 Sgl1 的定位提供了条件,并为在不同生理、病理和毒理条件下,肠道和肾脏等器官中 Sgl1 的表达奠定了基础。

目前,不能有效地超量表达及纯化具有生物活性的膜转运蛋白成了膜蛋白结构和功能研究的瓶颈。在构建和表达重组膜蛋白时,必须考虑蛋白质的拓扑学结构,即蛋白质序的跨膜片段在膜上的取向,尤其是所表达的膜蛋白的 N 端和 C 端同时位于胞质或者胞外一侧时<sup>[23]</sup>,重组膜蛋白将

不能得到有效的表达。鲤肠道 *sgt1* 基因全长 1 977 bp,其 Sgl1 蛋白具有 14 个跨膜域,且其 N 端和 C 端位于胞外一侧,所以重组表达 *sgt1* 基因全长存在一定的困难。因此,在前期成功克隆得到 *sgt1* 基因的基础上,通过分析其免疫原性选取含有抗原决定簇的片段,大小为 276 bp,插入表达载体 pET-32a(+ )的多克隆位点中,构建重组表达质粒 pET-32a(+ )-*sgt1*-P,通过 IPTG 诱导,表达出 30 ku 的融合蛋白。以融合蛋白作为抗原免疫新西兰长耳兔,获得 Sgl1 抗体血清,ELISA 检测抗血清效价,抗血清的效价达到 1:10<sup>5</sup>,免疫组织化学结果显示 Sgl1 抗体具有较高亲和力和特异性。

#### 参考文献:

- [1] Dyer J, Daly K, Salmon K S, et al. Intestinal glucose sensing and regulation of intestinal glucose absorption [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2007, 35 (5):1191-1194.
- [2] Veyhl M, Spangenberg J, Pusehel B, et al. Cloning of a membrane associated protein which modifies activity and properties of the Na<sup>+</sup>-D-glucose co-transporter [J]. *Journal of Biology Chemistry*, 1993, 268 (33):25041-25053.
- [3] Zhou L B, Cryan E V, D' Andrea M R, et al. Human cardiomyocytes express high level of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter 1 (SGLT1) [J]. *Journal of Cell Biochemistry*, 2003, 90 (2):339-346.

- [4] Balen D, Ljubojevic M, Breljak D, *et al.* Revised immunolocalization of the Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1 in rat organs with an improved antibody[J]. *American Journal of Physiology & Cell Physiology*, 2008, 295(2): C475 – C489.
- [5] Hirsh A J, Cheeseman C I. Cholecystokinin decreases intestinal hexose absorption by a parallel reduction in SGLT<sub>1</sub> abundance in the brush-border membrane [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(23): 14545 – 14549.
- [6] Ikeda T S, Hwang E S, Coady M J, *et al.* Characterization of a Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter cloned from rabbit small intestine[J]. *The Journal of Membrane Biology*, 1989, 110(1): 87 – 95.
- [7] Loo D D F, Zeuthen T, Chandy G, *et al.* Cotransporter of water by the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporters [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(23): 13367 – 13370.
- [8] Diez-Sampedro A, Barcelona S. Sugar binding residue affects apparent Na<sup>+</sup> affinity and transport stoichiometry in mouse sodium/glucose cotransporter type 3B[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(10): 7975 – 7982.
- [9] Sabino-Silva R, Mori R C, David-Silva A, *et al.* The Na<sup>+</sup>/glucose cotransporters: from genes to therapy [J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2010, 43(11): 1019 – 1026.
- [10] Luis R. One-hundred years of inquiry: the mechanism of glucose absorption in the intestine [J]. *Annual Review of Physiology*, 2000, 62: 939 – 946.
- [11] Quick M, Tomasevic J, Wright E M. Functional asymmetry of the human Na<sup>+</sup>/glucose transporter (HsGLT1) in bacterial membrane vesicles [J]. *Biochemistry*, 2003, 42(30): 9147 – 9152.
- [12] Wright E M, Loo D D F, Hirayama B A. Biology of human sodium glucose transporters[J]. *Physiological Reviews*, 2011, 91(2): 733 – 794.
- [13] Tarpey P S, Wood I S, Schirazi-Beechey S P, *et al.* Amino acid sequence and the cellular location of the Na<sup>+</sup>-dependent D-glucose symporters (SGLT1) in the ovine enterocyte and the parotid acinar cell[J]. *Biochemical Journal*, 1995, 312: 293 – 300.
- [14] Hediger M A, Coady M J, Ikeda T S, *et al.* Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter [J]. *Nature*, 1987, 330: 379 – 381.
- [15] Turk E, Wright E M. Membrane topology motifs in the SGLT Co-transporter family [J]. *Journal of Membrane Biology*, 1997, 159(1): 1 – 20.
- [16] Kellett G L, Brot-Laroche E, Mace O J. Sugar absorption in the intestine: The role of GLUT2 [J]. *Annual Review of Nutrition*, 2008, 28: 35 – 54.
- [17] Niloofar M, Tabatabai N M, Blumenthal S S, *et al.* Adverse effect of cadmium on binding of transcription factor Spl to the GC-rich regions of the mouse sodium-glucose cotransporter 1, SGLT1, promoter [J]. *Toxicology*, 2005, 207(3): 369 – 382.
- [18] Katsumi N, Yoshio H. Substrate specificity of a chimera made from *Xenopus* SGLT1-like protein and rabbit SGLT1 [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes*, 2006, 1758(6): 747 – 754.
- [19] Ana D S. Involvement of amino acid 36 in TM1 in voltage sensitivity in mouse Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT1 [J]. *Journal of Membrane Biology*, 2009, 227(2): 57 – 66.
- [20] Hiroshi M, Jun D, Yusuke M, *et al.* Cyclic diarylheptanoids as Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter (SGLT) inhibitors from *Acer nikoense* [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20(3): 1070 – 1074.
- [21] Nie G X, Hou C X, Wang J L, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of *sglt1* and tertiary structure prediction of deduced protein in *Cyprinus carpio* L [J]. *Life Science Journal*, 2011, 8(2): 204 – 212.
- [22] Martin G M, Turk E, Lostao M P, *et al.* Defects in Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) trafficking and function cause glucose-galactose malabsorption [J]. *Nature Genetics*, 1996, 12(2): 216 – 220.
- [23] 谢浩, 李其昌, 郭小明. 膜转运蛋白的功能性超表达和纯化 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23(12): 1051 – 1058.

## Expression of *sgt1* gene in *Cyprinus carpio* and preparation of its polyclonal antibody

NIE Guo-xing<sup>\*</sup>, WANG Bei, YAN Xiao, HOU Cai-xia, ZHANG Jian-xin,  
ZHANG Xin-sheng, ZHENG Jun-lin, WANG Jun-li

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** The high-affinity Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SglT1 is one of the important members of the sodium:solute symporter family (SSF), belonging to the homologous family 5 (SLC5). The SglT1 plays an important role in accumulating glucoses from intestinal or kidney epithelial cells against an adverse concentration gradient and maintaining the adjustment of metabolism. So far, few studies on Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter have been reported in the freshwater fishes. This research would develop special antibodies of SglT1, which could supply the foundation for the research of glucose metabolism in *Cyprinus carpio* intestines on molecular level. To study the molecular mechanism of glucose metabolism in freshwater fishes, the full-length cDNA of *sgt1* in *C. carpio* with an ORF of 1 977 bp was cloned and the antigenicity of SglT1 was first predicted. 92 (544 – 637) amino acids with strong antigenicity and immunogenicity were selected as target section of *sgt1* in *C. carpio* and were cloned into plasmid pET-32a(+) vector which had restriction sites for *EcoR* I and *Hind* III. The recombinant plasmid named pET-32a(+)-*sgt1*-P was transformed into *E. coli* Rosetta. The SglT1-P fusion protein of approximately 30 ku was highly expressed in *E. coli* Rosetta after being induced with IPTG. The purified fusion protein was used as antigen to immunize New Zealand Rabbits with ear margin veins by subcutaneous injection with power. The results of ELISA showed that the titer of the antiserum was about 1:10<sup>5</sup>. The SglT1-P polyclonal antibody was used to determine the expression of SglT1 protein in *C. carpio* intestines through immunohistochemical method. The result revealed that the antibody performed high affinity and specificity and could be applied to study the expression and locating of SglT1 in the *C. carpio*. The SglT1-P polyclonal antibody also could serve as an important research tool to study SglT1 expression and transshipment activity of *C. carpio*. Meanwhile, the SglT1-P polyclonal antibody could also be used to exploratively study the expression location and quantity of the SglT1 transporters in other fishes.

**Key words:** *Cyprinus carpio*; sodium/glucose cotransporter 1 (SglT1); prokaryotic expression; ELISA; antibody titer

**Corresponding author:** NIE Guo-xing. E-mail: niegx@htu.cn