

文章编号:1000-0615(2007)01-0045-09

翘嘴红鲌肝脏 G6Pase 催化亚基的克隆以及摄食和饲料中碳水化合物对其表达的影响

唐永凯, 俞菊华, 刘波, 戈贤平

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心

农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室,江苏 无锡 214081)

摘要:本文采用 RT-PCR 和 RACE 法分离、克隆了翘嘴红鲌 G6Pase 催化亚基基因全长 cDNA, 共 1900 bp [不含 poly(A)], 包括 49 bp 5'非翻译区, 1068 bp 阅读框以及含 Poly(A) 信号 AATAAA 的 778 bp 3'非翻译区[不包括 Poly(A)]。阅读框共编码 355 个氨基酸, 分子量为 39.89 ku。序列比对分析表明翘嘴红鲌 G6Pase 与斑马鱼 G6Pase 的相似性高达 95%, 与鼠、狗、人 G6Pase 的相似性为 63%, 和光滑爪蟾、金头鲷、河豚等 G6Pase 的相似性分别为 69%、55%、76%, 并具有 G6Pase 特有的 3 个保守基序。为了研究摄食以及饲料中碳水化合物对 G6Pase 的影响, 使用实时定量 RT-PCR 分别测定了饲喂等能但不含碳水化合物和含 23.98% 碳水化合物的饲料的翘嘴红鲌肝脏 G6Pase 基因的表达水平, 在使用上述饲料饲喂 8 周后, 禁食 48 h, 然后测定禁食和摄食后 3、6、12、24 h G6Pase mRNA 的表达量, 结果显示摄食后 12 h, 两组 G6Pase 的表达明显增加, 说明摄食影响 G6Pase 基因的表达, 禁食和摄食后 3~12 h, 含糖组 G6Pase 基因的表达量为无糖组的 2~4 倍, 这表明碳水化合物可以诱导 G6Pase mRNA 的表达。

关键词:快速扩增 cDNA 末端; 葡萄糖 6-磷酸酶; 碳水化合物; 翘嘴红鲌; 实时定量 PCR

中图分类号: S 917

文献标识码: A

Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from *Erythroculter ilishaeformis*: response of its expression to refeeding and carbohydrate in diet

TANG Yong-kai, YU Ju-hua, LIU Bo, GE Xian-ping

(Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology Certificated by the Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Liver glucose-6-phosphatase (G6Pase, EC 3.1.3.9), one of the key enzymes in the glycolysis and glyconeogenesis, plays a key role in blood glucose homeostasis by catalyzing the dephosphorylation of glucose-6-phosphate (Glu-6P) to glucose. RT-PCR and RACE (rapid amplification cDNA ends) was used for the isolation of the full length cDNA of G6Pase gene from liver of *Erythroculter ilishaeformis*. The cDNA was 1913 bp containing the 49 bp 5'-untranslated region, 778 bp 3'-untranslated region and 1068 bp open reading frame, which encoded 355 amino acid with a predicted molecular weight of 39.89 ku. We

收稿日期: 2006-06-19

资助项目: 国家重点基础研究“九七三”规划项目(2004CB117401)

作者简介: 唐永凯(1978-), 男, 湖北黄冈人, 实习研究员, 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: tangyk@ffrc.cn

通讯作者: 戈贤平, E-mail: gexp@ffrc.cn

compared the *E. ilishaeformis* alignment of deduced amino acid sequences of G6Pase cDNA with *Danio rerio*, *Mus musculus*, *Canis familiaris*, *Homo sapiens*, *Xenopus laevis*, *Sparus aurata* and *Tetraodon nigroviridis*. The score was 95%, 63%, 63%, 63%, 63%, 69%, 55% and 76% respectively. *E. ilishaeformis* G6Pase also contained three conserved domains. To examine the relationship between dietary carbohydrate and G6Pase gene expression, we compared the G6Pase mRNA levels in different dietary with or without carbohydrate. Two groups of *Erythroculter ilishaeformis* were pair-fed for 8 weeks either a high protein without carbohydrate (63.38% protein, 0 carbohydrate) or a low protein with carbohydrate (40.53% protein, 23.98% carbohydrate) diet. Real time RT-PCR was used to examine the levels of G6Pase mRNA in fasted and 3, 6, 12, 24 h after feeding in contrast to the different dietary. There was some increase in the level of G6Pase mRNA in dietary with and without carbohydrates at 12 h after feeding, which showed that refeeding affected the gene expression of G6Pase. Levels of G6Pase mRNA were 2–4 times in dietary with carbohydrate than those without carbohydrate at fasted and 3, 6, 12 h after feeding. These results showed that dietary carbohydrate can enhance the liver G6Pase gene expression.

Key words: RACE; G6Pase; carbohydrate; *Erythroculter ilishaeformis*; real time PCR

葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6Pase, EC 3.1.3.9) 是一种膜结合酶, 主要存在于肝和肾细胞中的内质网膜及核膜上, 催化葡萄糖-6-磷酸分解为葡萄糖和磷酸, 是糖异生和糖原分解两个代谢途径中的关键酶之一, 调节着生物体内的血糖水平^[1]。G6Pase 酶系包括催化亚基 P36 蛋白和转运酶 P46 蛋白, P36、P46 基因的突变均会导致葡萄糖储存疾病^[2]。哺乳类动物肝脏 G6Pase 的表达受体多种激素 (如胰高血糖素和糖皮质激素促进 G6Pase 转录, 但胰岛素却抑制其转录) 和营养状况的调控影响^[3-5], 有关鱼类营养因子和 G6Pase 的关系还知之甚少, 对该基因的研究也仅有少数几种鱼类。如葡萄糖和果糖可抑制鲤 G6Pase 的表达及其酶活性^[6-7], 但在虹鳟、金头鲷, 饲料中的碳水化合物却不影响 G6Pase 的表达, 这表明鱼类 G6Pase 的调控比较复杂^[8-10]。翘嘴红鲌 (*Erythroculter ilishaeformis*) 为鲤科淡水经济鱼类之一, 野生翘嘴红鲌是以活鱼为主食的凶猛肉食性鱼类, 有关该鱼的糖代谢酶的研究还未见报道。本研究分离了翘嘴红鲌肝脏 G6Pase 催化亚基 cDNA 全序列, 对其全序列进

行比较和分析, 并应用实时定量 PCR 检测无糖和含糖 (23.98%) 条件下 G6Pase 基因的表达水平, 确定饲料中糖对翘嘴红鲌 G6Pase 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验设计和试剂

实验设计 翘嘴红鲌鱼种平均 (40.32 ± 0.39) g, 共 500 尾, 购自浙江省淡水水产研究所试验场。先用普通颗粒饲料喂养 2 周让其适应环境, 然后将试验鱼随机分为两组, 分别投喂等能的无糖饲料 (粗蛋白 63.38%, 粗脂肪 9.13%) 和含糖饲料 (含可消化糖量 23.98%, 粗蛋白量 40.11%, 粗脂肪 9.94%), 每组设 3 个重复, 每个重复 60 尾, 养在规格为 200 cm × 800 cm × 100 cm 的室内水泥池中。饲料保持总能一致, 饲养 8 周, 日投喂饲料量为鱼体重的 2%~4%。采样前先饥饿 48 h, 然后分别于投料后 0、3 h、6 h、12 h、24 h 采取肝脏, 每个重复取 3 尾。养殖结果表明两组鱼死亡率分别为 6.67% 和 5.33%, 增重率分别为 134% 和 103%, *t*-检验表明两者没有显著差异, 具体数据见表 1。

表 1 饲料中不同糖对翘嘴红鲌增重率与死亡率的影响

Tab. 1 Effect of different carbohydrate levels of diets on weight gain rate and mortality rate of *E. ilishaeformis*

组别 group	初均重 (g) initial average weight	末均重 (g) final average weight	增重率 (%) weight gain rate	死亡率 (%) mortality rate
无糖组	41.48 ± 0.85	97.40 ± 6.66	134.36 ± 11.21	6.67 ± 1.15
含糖组	40.34 ± 0.97	81.99 ± 2.43	103.33 ± 5.85	5.33 ± 3.06

注: 表中值为平均值 ± 标准误 (n = 3); 同一列数据中有不同字母表示差异显著 (P < 0.05)

Notes: Values are means ± SE (n = 3); within the same column different letters are significantly different (P < 0.05)

主要试剂 抽提 RNA 用 Trizol Reagent (Promega)、M-MLV 反转录酶、*Taq* 酶、*RnaseH*、TdT 酶、 T_4 DNA 连接酶、PCR 液和胶回收试剂盒, SYBR ExScript™ RT-PCR Kit 均购自大连 Takara 公司; pUCm-T 载体购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 方法

引物设计与合成 实验所用的引物碱基位置根据登录 GenBank 序列(GenBank:DQ323499)

确定。P1、P2 是根据已知鱼类 G6Pase 的保守片段,使用 CodeHop 原理^[11]设计的;P3、P4 是根据 P1 和 P2 分离得到的序列,使用软件 Primer 5.0 设计的 3'RACE 特异引物;P5、P6、P7 是根据 P1 和 P2 引物分离的片段。设计的 5'RACE 引物。P8、P9 是 G6Pase 实时定量 RT-PCR 的引物,P10、P11 是 β -actin 引物,所有引物均由上海申能博彩生物有限公司合成,其中 R = A + G, N = A + C + T + G, Y = T + C(表 2)。

表 2 实验中使用的引物

Tab. 2 Primers used in isolation of G6Pase cDNA and Real time RT-PCR

引物 primers	序列 sequence	序列位置 site
degenerate primer	P1 5' - GCA GTT TCC CAT CAC CTG YGA RAC NGG -3'	nt 358 -384
	P2 5' - CTG TCC AGG TGG ACC CAY TCN GG -3'	nt 816 -794
3 RACE	P3 5' - TCT TTA TCG CTG CTC ATT TCC -3'	nt 564 -584
	P4 5' - AGC CCA GAG GTG GTG TGT CA -3'	nt 772 -791
5 RACE	P5 5' - CAC CAC CTC TGG GCT TTC T -3'	nt 786 -768
	P6 5' - GGG AAA TGA GCA GCG ATA A -3'	nt 585 -567
	P7 5' - ACC GTC CAG AAG AGT GTC CAA A -3'	nt 537 -516
G6Pase	P8 5' - GCA GGC GTT ATT TCA GGC AT -3'	nt 599 -618
	P9 5' - CCA CAC CCA GAG CTT TCA GG -3'	nt 730 -749
β -actin	P10 5' - ACT TCG AGC AGG AGA T -3'	
	P11 5' - ACA GTG TTG GCA TAC AG -3'	

总 RNA 的抽提 取翘嘴红鲌肝脏 50 ~ 100 mg,用 Trizol Reagent 根据说明书操作,抽提总 RNA。使用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度,并根据 OD_{260/280} 值判断 RNA 的质量,一般为 1.9 ~ 2.0。

部分片段的分离 取 5 μ g 从肝脏抽提的总 RNA 以 dT-AP [dT-AP, 5'-CTG ATC TAG AGG TAC CGG ATC C(T)₁₆-3'] 为引物,用 M-MLV 根据使用说明进行 RT 反应,然后取 10% RT 液,使用引物 P1 和 P2 扩增 G6Pase 的部分片段,PCR 反应体系总体积 50 μ L,其中含 5 μ L 10 \times 反应缓冲液,2 μ mol \cdot L⁻¹ 氯化镁,200 μ mol \cdot L⁻¹ dNTP,引物各 0.4 μ mol \cdot L⁻¹,2.5 U *Taq* 酶。反应条件 94 $^{\circ}$ C 3 min, 然后 30 循环 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,最后 72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存;PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离,切胶,使用胶回收试剂盒回收,克隆到 T-载体,送测序。根据这序列设计特异的 3'RACE 和 5'RACE 引物,分离扩增 G6Pase 的 3'和 5'端序列。

3'RACE 方法 用 5 μ g 总 RNA 以 dT-AP (同上)为引物,用 M-MLV 根据使用说明进行

RT 反应,然后用 10% RT 液,以 AP [AP, 5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3'] 和 P3 为引物进行 PCR,反应总体积 50 μ L,反应体系、条件同上,为增加扩增效率及扩增的特异性,把上述 PCR 液稀释 10 倍,取 2 μ L 作模板,用引物 AP 和 P4 进行再扩增,产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收,克隆,送测序。

5'RACE 方法 原理参照参考文献[12 - 13],用 5 μ g 总 RNA,以 P5 为引物,用 M-MLV 根据使用说明进行 RT 反应,然后加 *RnaseH*,分解 mRNA,用回收试剂盒回收 cDNA,去除多余的 dNTP、引物等;再用 TdT 酶在 cDNA3'端加 poly(A),用试剂盒回收加了 poly(A) 尾的 cDNA,以此为模板,用 P6 及 dT - AP (同 3'RACE) 为引物,进行 PCR,反应体系组成同 3'RACE,PCR 液稀释 10 倍,取 2 μ L 为模板,用 P7 及 AP,进行 PCR,反应体系组成同上,PCR 液用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收,克隆,送测序。

测序和序列分析 PCR 产物克隆到 pUCm-T 载体后,送上海申能博彩生物有限公司

测序。用软件 DNATools 5.1^[14], ClustalW 1.8.1^[15]进行序列分析和比较。

G6Pase 的表达水平检测 采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 real time PCR 扩增反应,以翘嘴红鲌 β -actin 为内参,对得到的各样品 Ct 值进行均一化处理,以无糖组禁食时 G6Pase 基因的表达量为基准,应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[16]确定不同样品的 mRNA 的相对含量。

数据处理 实验数据用平均值 \pm 标准误表示,数据分析采用 SPSS 12.0 统计软件包中的单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan 氏多重比较分析以及独立样本 *t*-检验,取 *P* 值 0.05。

2 结果

2.1 G6Pase 基因的分离、克隆

使用翘嘴红鲌肝脏总 RNA 5 μ g,进行 RT-PCR,用 P1 和 P2 扩增得到 500 bp 左右的 DNA 片段(图 1-A),经克隆后测序,得到 459 bp 片段;3' RACE 结果获 1 200 bp 左右条带(图 1-B),测序得到 1 142 bp 的 DNA 片段;5' RACE 获得 500 bp 左右 DNA 条带(图 1-C),克隆后测序结果为 537 bp。

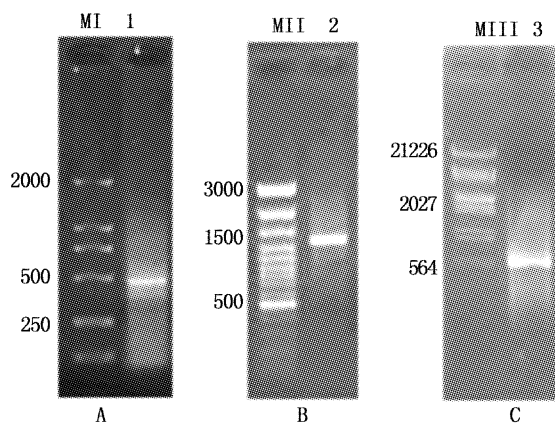


图 1 RT-PCR 电泳产物

Fig. 1 Results of RT-PCR

Marker I : DNA Marker DL2000; Marker II : GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus; Marker III : Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind* III Marker A, B, C 分别为 P1 和 P2, P4 和 AP, P7 和 Ap 扩增产物

A, B, C are RT-PCR products of P1 and P3, P3 and AP, P7 and AP, respectively

将上述序列拼接得到翘嘴红鲌 G6Pase 催化亚基 cDNA 全序列,该 cDNA 总长为 1 900 bp [不含 poly(A)],其中阅读框 1 068 bp,翻译 355

个氨基酸,测算的蛋白质分子量为 39.89 ku,5'非翻译区 49 bp(图 2),3'非翻译区 778 bp [不包括 poly(A)],第 1884 - 1889 位碱基为加尾信号 AATAAA。其中 42 - 281 位氨基酸为 PAP2_G6_Pase 结构域。

2.2 序列分析

使用 ClustalW1.81 对翘嘴红鲌 G6Pase 氨基酸序列与斑马鱼 (*Danio rerio* GenBank: XP-707877),金头鲂 (*Sparus aurata*, GenBank: AAK00977),黑青斑河鲃 (*Tetraodon nigroviridis*, GenBank: CAG06538),光滑爪蟾 (*Xenopus laevis*, GenBank: AAH54228),鼠 (*Mus musculus*, GenBank: XP-109303),狗 (*Canis familiaris*, GenBank: XP-855553),人 (*Homo sapiens*, GenBank: NP-000142)等动物的 G6Pase 氨基酸序列进行比较。结果显示,翘嘴红鲌 G6Pase 与斑马鱼的相似性高达 95%,与鼠、狗、人 G6Pase 的相似性为 63%,和光滑爪蟾、金头鲂、黑青斑河鲃 G6Pase 的相似性分别为 69%、55%、76%;这些序列中都存在葡萄糖-6-磷酸酶家族 PAP2 类似蛋白质 (type 2 phosphatidic acid phosphatase like proteins, PAP2-Glucose-6-Phosphates) 结构域,该结构域中有 3 个保守基序 (KXXXXXXXXRP, PSGH, SRXXXXXXXXHXXXQ/D)(图 3)。翘嘴红鲌 G6Pase 中 PAP2-Glucose-6-Phosphates 结构域与斑马鱼对应结构域相似性高达 97%,与人相似性为 68%,鼠为 67%,狗为 67%,与黑青斑河鲃 80%,蟾 74%,金头鲂 64%,这一方面说明该基因在进化中的保守性,以及其功能的一致性,另一方面也说明本实验分离的翘嘴红鲌 G6Pase 是哺乳动物 G6Pase 催化亚基的同源基因。

2.3 G6Pase 的系统发育

使用 CLUSTAL W 1.81,根据我们分离的翘嘴红鲌 G6Pase 以及已报道的其他动物的 G6Pase 序列进行该蛋白系统发育分析。由于比对分析结果表明无脊椎动物中果蝇 IP08113p 蛋白和 G6Pase 蛋白可能有同源关系,因此选择果蝇 IP08113p 蛋白作为外群,图 4 为 G6Pase phylogram 树,从图上可见,报道的金头鲂和慈鲷 (*A. nubilis*) 的 G6Pase 和其他动物的距离比较远,分属两个不同的支,在另一大支中斑马鱼、黑青斑河鲃和翘嘴红鲌又被归在一支,另一小支又可分为光滑爪蟾和鸡一支,鼠、人、狗一支。

```

1 CACT CTT GAC TAG CTC TAC AAC ACA TTC TGC CTC AGA GAA CAT CTA AAC ATG AAT GCT GTG 1913
                                     M N A V 4
62 ATG GAT ACA GTG CAT GGG TTC GGG GTG AGT AGC ACC CAA TAC CTG CAG ACC CAT TAC AAA 1913
5 M D T V H G F G V S S T Q Y L Q T H Y K 24
122 GAC GCC CAG GGA TGG TTT CTT TTC GTC TCC TTC GCG GCA GAT CTG AGG AAC ACC TTC TTC 1913
25 D A Q G W F L F V S F A A D L R N T F F 44
182 ATC TTC TTT CCC ATC TGG TTC CAT CTG AAA GAA TCA GTC GGC ATC AAG CTT ATT TGG GTG 1913
45 I F F P I W F H L K E S V G I K L I W V 64
242 GCT GTG ATA GGA GAT TGG CTC AAT TTG GTA TTC AAA TGG ATC CTG TTT GGA GAA CGT CCA 1913
65 A V I G D W L N L V F K W I L F G E R P 84
302 TAC TGG TGG GTC CAC GAG ACT TCC TAC TAC ATC AAC AGC TCA GCG CCT CAT ATT GAG CAG 1913
85 Y W W V H E T S Y Y I N S S A P H I E Q 104
362 TAT CCC ATG ACC TGT GAG ACT GGC CCA GGC AGT CCA TCT GGT CAC GCT ATG GGC GCT GCT 1913
105 Y P M T C E T G P G S P S G H A M G A A 124
422 GGT GTT TAC TAC ACA TTG GTC ACC TCC ATC CTC GCC ATA ATG CTG AGC AAA GAG AAG AAA 1913
125 G V Y Y T L V T S I L A I M L S K E K K 144
482 TCA TCG TCC AAG AGC CTA TAC TTA CGT GGT TCA CTT TGG ACA CTC TTC TGG ACG GTC CAG 1913
145 S S S K S L Y L R G S L W T L F W T V Q 164
542 GTC TGT GTA TGC CTC TCT CGA GTC TTT ATC GCT GCT CAT TTC CCC CAT CAA GTT TTT GCA 1913
165 V C V C L S R V F I A A H F P H Q V F A 184
602 GGC GTT ATT TCA GGC ATG ATC GTT GCC GAG GCC TTC AAC AGA CAG AAA TGG ATC TAT AGT 1913
285 G V I S G M I V A E A F N R Q K W I Y S 204
662 GCC AGT CTA AAG AAT TAC TTC AAC GTC ACG CTG TTC CTG CTC TCT TTT GCG GTG GGC TTG 1913
205 A S L K N Y F N V T L F L L S F A V G L 224
722 TAC GTG CTC CTG AAA GCT CTG GGT GTG GAC CTG CTG TGG ACC CTT GAG AAA GCC CAG AGG 1913
225 Y V L L K A L G V D L L W T L E K A Q R 244
782 TGG TGT GTC AAT CCA GCC TGG GTC CAT TTG GAC ACC ACA CCG TTC GCC AGC CTG TTG AGG 1913
245 W C V N P A W V H L D T T P F A S L L R 264
842 AAC ATG GGC ACC CTG TTC GGT CTG GGA CTC GGC CTT CAC TCC CCA CTA TAC ACG GAA AGC 1913
265 N M G T L F G L G L G L H S P L Y T E S 284
902 AAG AAG AGC AGC AAC GCT CGC GTC AGG ATC GCC TGT ATC GTC GCC TCT CTG TTT CTG CTG 1913
285 K K S S N A R V R I A C I V A S L F L L 304
962 CAT CTC TTC GAT TCC ATC AAG CCT CCC ACA CAC ACG GCT GCC CTC TTC TAC CTG TTG TCT 1913
305 H L F D S I K P P T H T A A L F Y L L S 324
1022 TTC TGC AAG AGC GCC ACC GTT CCC CTC GCC ACT GTC AGT ATC ATC CCG TAC TGC GTG TCC1913
325 F C K S A T V P L A T V S I I P Y C V S 344
1082 GGA ACC CTC GGT TTA CAA AGC AAG AAG CAG CTT TAA GTT GGG AAA GAA CTG TAC AAG ACT1913
345 G T L G L Q S K K Q L * 355
1142 GTA AGC AAC TGC CCA ACT ATT TAC AGT ATT TCA GAC TAG CAC ATT TTC CAT AGT TCA TCC1913
1202 TAT CAG TTG AAG GAA CTC TGC CTG ATG AAC AAC TTG CAA ACT AGG GGA TGC AGA TAA CTA1913
1262 GAG TTT AAT TTA AGC ACT GTT ATA GTG CAT GTA TTG TTT ATG GTG ATG TGA TGT ATG AGA1913
1322 TGA AGA ATT TTA GAA TTT AGA ATT TTT ATA TCT TAG GGG CCG TTT ACA TGA CAC CTT TTT1913
1382 TAA AAA ACG GAA AAC TTC TTA TGT GAG TTG GCC GTT TAT TTA TAC GAC AAT GTG TTT TGG1913
1442 GGG GCT GAA AAT GCA AAC CTT TGA AAA TTT GCG AAA ACG GTG ATG TCA CAC GCA TGC GTA1913
1502 TTA CGT GTT CAT TCT ATA GGC GAG TAG TTT TTC TTT ACA AAG TGA CAT CGC CAA CTA CTG1913
1562 GCC TGG CAG GAG AAT ACA GAG TTT TTA GTC ATT TAC GTG GAT CTG TGT GAA TGG GGA TTT1913
1622 CAC GTC TGT ACG TGA AAA ACG CAA AGG TAA AAA CGT AAA TTG TTG CCA TGT AAA TGT GCC1913
1682 CTT ATG CCT TTG GAT CTA GAA GAA AAG GTC TGG AAT TTG ACA AAA GAA GTG TTC TTT TTT1913
1742 GAG AAC TGA AAT AAT AAA ATA AAC TAC AGT ATA GAT ATA TAT ATA TAG GAG GAC AAA ATT1913
1802 TGT CCT CCC TAA GAT ATG TAC TTT TTT TGG GAT GTA TTT TCT GTA ATA TTC TAT TTT TTT1913
1862 GGA AAT TCT TTA GGT CAT TTT TAA TAA AAT ACT CAA AAC AAA AAA AAA AAA A 1913

```

图 2 翘嘴红鲌 G6Pase 全长 cDNA 序列及翻译的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *E. ilishaeformis* G6Pase cDNA

阅读框 1068 bp, 翻译 355 个氨基酸。划线部分为 PAP2 _ G6 _ Pase 结构域, 起始密码子和终止子用黑体表示, poly (A) 加尾信号用斜体表示

The 1068 bp ORF encodes a protein of 355 amino acids in length. The PAP2_G6_Pase domain is underlined. Translation start and stop codons was are in boldface. Poly(A) signal is indicated in italic

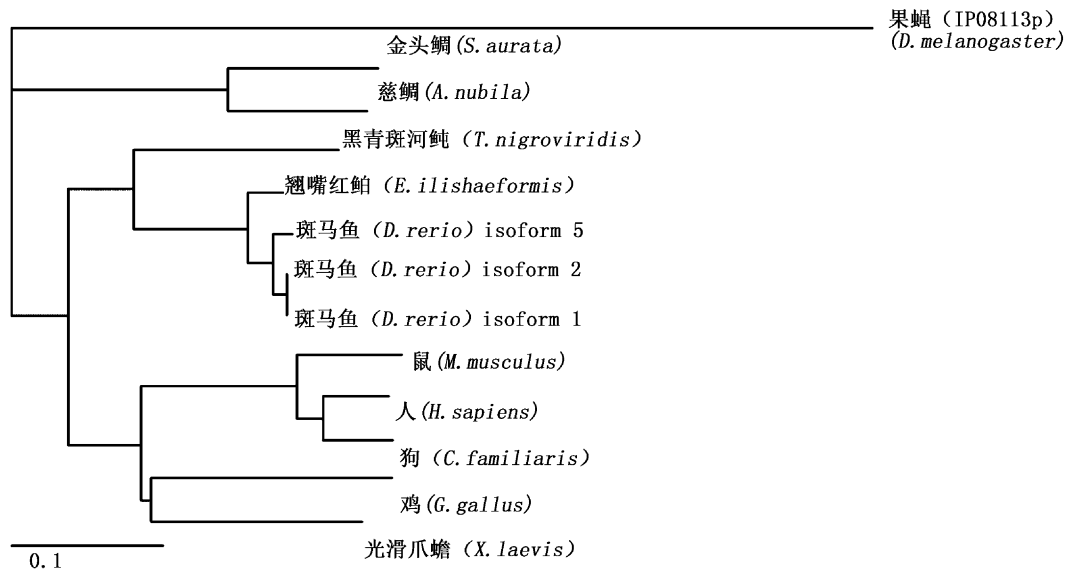


图 4 用 ClustalW1.81 构建的 G6Pase 系统树

Fig. 4 Phylogenetic tree of G6Pase using ClustalW1.81

2.4 饲料中碳水化合物对 G6Pase mRNA 表达水平的影响 应用实时定量 PCR 得到各样品的 Ct 值,以翘嘴红鲌 β -actin 为内参,对各样品的 Ct 值进行均一化处理,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法求得各样品 mRNA 的相对含量,然后运用 SPSS 对各数据进行统计分析,得到的最终结果如图 5。

从图 5 中可看出:在等能量的条件下,从禁食后 48 h 到投喂饲料后 3、6、12 h,含糖组 G6Pase 基因的表达量始终比无糖组高,是它的 2~4 倍,存在显著性的差异 ($P < 0.05$),但在 24 h 时,无糖组 G6Pase 基因的表达量却比含糖组高,是它的 1.4 倍。与禁食相比,无糖组投喂饲料后 12、24 h 显著 ($P < 0.05$) 增加了 G6Pase 基因表达量,而含糖组 24 h 显著减少了 G6Pase 基因的表达量,其它各时间段差别不显著,但 12 h 时 G6Pase 基因表达量最大。

3 讨论

3.1 G6Pase 的保守性

将翘嘴红鲌和其他动物的 G6Pase 氨基酸序列进行比较,发现它们之间的相似性较高。除了金头鲌为 55% 外,其它均大于 60%,特别是 G6Pase 特征序列 PAP2 结构域,其相似性均大于 64%,这说明我们分离到的翘嘴红鲌 G6Pase 应该是 G6Pase 催化亚基的同源序列。系统树的分析

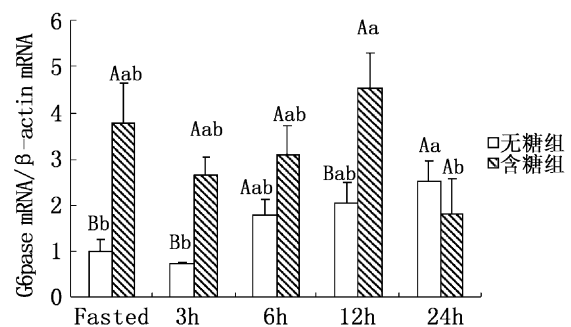


图 5 无糖组和含糖组在禁食和摄食后 G6Pase mRNA 水平的变化

Fig. 5 Change of G6Pase mRNA during fasted and postprandial time in fish fed with and without carbohydrate

不同小写字母表示同一组在不同时间内 LSD 多重比较差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示同一时间内各组之间独立样本 t -检验差异显著 ($P < 0.05$), 图中值为平均值 \pm 标准误, $n = 9$

LSD multiple range test: different superscript letter are significant different among different time of the same group ($P < 0.05$); Independent-Samples t -test: different capital letter are significant different among different group of the same time ($P < 0.05$); Values are mean \pm SE, $n = 9$

把斑马鱼、翘嘴红鲌、黑青斑河鲶和其他动物的 G6Pase 分在同一支,这表明 G6Pase 在进化过程中所受的选择压力较大,所以变异较小,保守性很高,也说明了其功能比较一致。系统树显示金头鲌、慈鲌被单独分在了一支,其遗传距离和斑马鱼、人等的较远,这有可能是由于进化地位不同造

成的,但也有可能分离到的是鱼类中的另一个 G6Pase 基因。因为鱼类在进化早期基因组进行复制,许多在人等哺乳动物中是一个基因而在鱼类中却存在两个基因,但这需要进一步确认,因为至今斑马鱼中分离到的 5 个 G6Pase 异构体没有一个与金头鲷的分在一支(图 4 没有显示全部异构体),同时对其序列进行比较,发现这些异构体主要在 5' 以及 3' 端存在差别,这很可能是由于基因不同切割造成的,而不是来自不同基因,因此可能还没有分离到斑马鱼的另一个 G6Pase,也有可能另一个 G6Pase 已经退化或沉默了。

3.2 饲料中碳水化合物对 G6Pase 基因表达的影响 哺乳类动物中,饲料中的营养素影响着 G6Pase 的表达和活性,但在鱼类情况比较复杂。Panserat 等^[8]发现虹鳟在摄食淀粉含量为 8% ~ 20% 的饲料 10 周后 G6Pase 活性及表达没有显著差异,摄食后 6 ~ 24 h 内也没有明显变化;Furuichi 等^[6]和 Shikata 等^[7]则报道鲤摄食含淀粉、葡萄糖、果糖的饲料后糖异生酶(包括 G6Pase)活性受到明显抑制,但在金头鲷上,Meton 等^[10]发现饲料中的碳水化合物不影响 G6Pase 的表达。而我们的实验结果显示糖能促进翘嘴红鲌 G6Pase 的表达,禁食时,含糖组 G6Pase mRNA 含量是无糖组的 3.78 倍,摄食后 3 ~ 12 h,含糖组 G6Pase mRNA 含量是无糖组的 2 ~ 3 倍。至于摄食后 24 h,无糖组 G6Pase 基因表达量反而比含糖组高,可能是由于此时饲料中的糖已完全消化吸收,糖促进 G6Pase 表达有所降低,这也与我们测得的血液指标(24 h 含糖组血糖浓度比无糖组低,而其它各时间段含糖组血糖浓度均比无糖组高^[17])相一致。

3.3 摄食对 G6Pase 基因表达的影响

饥饿后,重新投喂饲料,无糖组和含糖组 G6Pase 基因表达量均降低(3 h),这与 Meton 等^[10]在金头鲷上研究的结果一致。摄食后 3、6、12 h,无糖组和含糖组 G6Pase 基因表达量一直呈上升趋势,这表明高蛋白(无糖组)也能促进 G6Pase 基因的表达,促使肝中氨基酸转化为糖元,在虹鳟中,高蛋白也可促进糖异生作用^[18]。而含糖组 G6Pase 基因表达量的增加可能与体内持续的高血糖^[17]相关,在哺乳类动物上也发现了类似的规律^[19-21]。尽管肉食性鱼类对碳水化合物利用率较低,但我们发现翘嘴红鲌也能适应高

碳水化合物/低蛋白的饲料,饲料糖促进了糖异生作用,而生成的糖元可作为糖酵解以及磷酸戊糖途径的底物。因此,有必要继续深入研究饲料中碳水化合物对翘嘴红鲌糖代谢酶的调控。

参考文献:

- [1] Mithieux G. New knowledge regarding glucose-6-phosphat-ase gene and protein and their roles in the regulation of glucose metabolism [J]. *Eur J Endocrinol*, 1997, 136:137 - 145.
- [2] Foster J D, Pederson B A, Nordlie R C. Glucose-6-phosphatase structure, regulation and function: an update[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1997, 215: 314 - 332.
- [3] Argaud D, Zhang Q, Pan W, *et al.* Regulation of rat liver glucose-6-phosphatase gene expression in different nutritional and hormonal states [J]. *Diabetes*, 1997, 45: 1563 - 1571.
- [4] Streeper R S, Svitek C A, Chapman S, *et al.* A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272 (18): 11698 - 11701.
- [5] Dickens M, Svitek C A, Culbert A A, *et al.* Central role for phosphatidylinositol 3-kinase in the repression of glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(32): 20144 - 20149.
- [6] Furuichi M, Yone Y. Changes in activities of hepatic enzymes related to carbohydrate metabolism of fishes in glucose and insulin-glucose tolerance tests [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1982, 48: 463 - 466.
- [7] Shikata T, Iwagana S, Shimeno S. Effects of dietary glucose, fructose and galactose on hepatopancreatic enzyme activities and body composition in carp [J]. *Fish Sci*, 1994, 60(5): 613 - 617.
- [8] Panserat S, Medale F, Breque J, *et al.* Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2000, 11 (1): 22 - 29.
- [9] Panserat S, Plagnes-Juan E, Kaushik S. Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus*

- carpio) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1579(1): 35 - 42.
- [10] Meton I, Caseras A, Fernandez F, *et al.* Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2004, 138(2): 145 - 53.
- [11] Rose T M, Schultz E R, Henikoff J G, *et al.* Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly-related sequences [J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26 (7): 1628 - 1635.
- [12] 穆里斯, F 费里, R 吉布斯, 等. PCR 聚合酶链式反应 [M]. 北京: 科学出版社, 1994: 25 - 35.
- [13] 俞菊华, 吴婷婷, 杨 弘, 等. RACE 法分离团头鲂生长抑素全长 cDNA 及其序列测定 [J]. *水产学报*, 2003, 27(6): 533 - 539.
- [14] <http://www.crc.dk/dnatools/>.
- [15] <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>.
- [16] Kenneth J L, Thomas D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402 - 408.
- [17] 戈贤平. 翘嘴红鲌糖代谢主要酶 G6Pase、GK、PEPCK 的调控 [D]. 南京: 南京农业大学博士论文, 2006.
- [18] Kirchner S, Kaushik S, Panserat S. Low protein intake is associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Nutr*, 2003, 133, 2561 - 2564.
- [19] Argaud D, Zhang Q, Pan W, *et al.* Regulation of rat liver glucose-6-phosphatase gene expression in different nutritional and hormonal states: Gene structure and 5V-flanking sequence [J]. *Diabetes*, 1996, 45, 1563 - 1571.
- [20] Massillon D. Regulation of glucose-6-phosphatase gene by glucose occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms [J]. *Biol Chem*, 2001, 276, 4055 - 4062.
- [21] Pagliassotti M J, Wei Y, Bizeau M E. Glucose-6-phosphatase activity is not suppressed but the mRNA level is increased by a sucrose-enriched meal in rats [J]. *Nutr*, 2003, 133, 32 - 37.