

DOI: 10.12264/JFSC2023-0034

罗氏沼虾 *GLUT1* 基因克隆及其在血糖稳态调节中的功能

许文静, 丁千千, 高炜峰, 敖士齐, 朱玉洁, 高晓建, 张晓君, 姜群

扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009

摘要: 为了探究葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter type 1, GLUT1) 在罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 糖代谢调控中的作用, 本研究采用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 克隆获得罗氏沼虾 *Mr-GLUT1* 基因全长 cDNA 序列, 该基因全长 1929 bp, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 1446 bp, 编码 481 个氨基酸, 分子量为 52035.73, 等电点为 6.76。多序列比对及系统进化树分析结果显示, 十足目 *GLUT1* 基因具有较高同源性, 均存在 12 个跨膜结构域, 罗氏沼虾 *GLUT1* 与对虾首先聚为一支, 表明亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 结果显示, *Mr-GLUT1* 在罗氏沼虾各组织均有表达, 肠道表达量最高。葡萄糖注射后, 罗氏沼虾血淋巴葡萄糖水平、肝糖原和肌糖原含量迅速升高, 肠道、肝胰腺和肌肉组织 *Mr-GLUT1* 基因表达显著上调, 但 *Mr-GLUT1* 基因表达变化时间延迟于葡萄糖含量的变化。RNA 干扰沉默罗氏沼虾体内 *Mr-GLUT1* 基因表达后, 血淋巴中葡萄糖和海藻糖含量显著上升。研究表明, *Mr-GLUT1* 基因可能参与罗氏沼虾血糖稳态调节, 在葡萄糖和海藻糖转运过程中发挥重要作用。

关键词: 罗氏沼虾; *GLUT1*; 基因克隆; 糖代谢; RNA 干扰

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)04-0415-10

葡萄糖是生物的主要供能物质, 作为极性大分子, 葡萄糖需依赖转运载体完成跨膜转运。真核生物主要存在 3 种葡萄糖转运载体: 钠-葡萄糖协同转运蛋白 (sodium-glucose cotransporters, SGLTs)、葡萄糖转运蛋白 (glucose transporters, GLUTs) 和植物的糖转运蛋白 (sugar will eventually be exported transporters, SWEETs)^[1]。GLUTs 作为重要的糖转运载体, 在糖代谢和稳态调节研究中备受关注。目前已经发现 14 种类型 GLUT, 并根据组织特异性分布和功能结构差异分为 3 类^[2], 其中 I 类家族中的 *GLUT1*~4 基因的研究最为广泛。

GLUT1 由 *SLC2A1* 基因编码, 是最早发现的葡萄糖转运蛋白^[3], 广泛分布于机体各组织中, 其中脑、肌肉、脂肪和红细胞等组织中表达量较

高^[4]。*GLUT1* 基因在不同物种中高度保守, 小鼠、大鼠、猪和人的 *GLUT1* 蛋白氨基酸同源性高达 97%^[5]。近年来在多个水产动物中发现了与哺乳动物同源的 *GLUT1* 基因^[6], 然而其功能在不同物种中存在差异。在军曹鱼 (*Rachycentron canadum*)^[7]、企鹅珍珠贝 (*Pteria penguin*)^[8]、大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)^[9]、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[10-11]、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[12] 等水产物种中发现, 盐度/低氧等环境胁迫、葡萄糖注射以及高糖饲料投喂等可引起生物体葡萄糖负荷变化, 并影响 *GLUT1* 基因表达, 表明 *GLUT1* 表达与机体葡萄糖水平密切相关, 推测 *GLUT1* 在上述水产物种的葡萄糖转运、糖稳态调节中发挥重要作用。然而, 在对珍珠龙胆石斑鱼 (*Epinephelus*

收稿日期: 2023-02-21; 修订日期: 2023-03-02.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32002386); 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目 (JBGS[2021]120); 江苏现代农业产业技术体系建设专项 (JATS[2022]504).

作者简介: 许文静 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产养殖学. E-mail: xwj1914454007@163.com

通信作者: 姜群, 副教授, 研究方向为水产养殖学. E-mail: jiangqun1013@163.com

fuscoguttatus♀×*E. lanceolatus*♂)^[13]和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[14]的研究中发现, 饲料中糖类含量及环境因素的改变并未影响 *GLUT1* 基因的表达水平^[15], 推测 *GLUT1* 功能在不同物种中可能存在差异。

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)是我国重要的水产经济物种, 因其肉质鲜美、生长周期短、经济效益高等特点, 已成为部分地区的支柱产业^[16]。饲料是罗氏沼虾养殖的主要成本之一, 糖类作为最廉价的能源物质, 其在罗氏沼虾饲料中的添加量却远低于畜禽, 因为添加量过高可引发罗氏沼虾持续性高血糖症状, 进而导致生长缓慢、抗病力下降、死亡率升高等现象^[17-18]。限制饲料中糖类添加的主要原因在于罗氏沼虾对糖类的利用能力较低, 本研究拟从 *GLUT1* 基因入手, 采用 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)克隆获得罗氏沼虾 *GLUT1* 基因, 并进一步分析其在糖代谢调节中的作用, 以期为解析罗氏沼虾对糖类的利用能力低下的问题提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验设计与样品采集

实验用虾由扬州富源水产有限公司提供, 在扬州大学水产温室中暂养, 日投喂 2 次, 定期吸污换水。随机选取 6 只体重为(10.0±1.0) g 的健康罗氏沼虾, 分别采集胃、鳃、脑、腹神经节、肠道、肌肉、肝胰腺、眼柄、心脏组织样品, 液氮速冻后-80 °C 冰箱保存, 用于 *GLUT1* 基因克隆和组织特异性表达检测。

随机挑选 80 尾体重为(4.2±0.5) g 的健康罗氏沼虾开展葡萄糖注射实验, 平均分为 2 组(实验组和对照组), 每组 3 个重复, 实验组按照 1 mg 葡萄糖/g 体重的剂量注射葡萄糖, 对照组注射等量生理盐水, 注射部位为罗氏沼虾第五附肢基部, 注射前(0 h)及注射后 1、2、4、8 和 12 h 取样, 实验组和对照组分别取 6 尾罗氏沼虾, 采集肠道、肌肉、肝胰腺、血淋巴样品, 血淋巴样品收集于肝素钠抗凝管中, 4000 r/min 离心 5 min 取上层血清, 液氮速冻后-80 °C 保存。

随机挑选 24 尾体重为(2.0±0.5) g 的健康罗氏沼虾开展 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)实验, 个体平均分为 2 组(实验组和对照组), 每组 3 个重复, 参照范红弟等^[19]的方法制备 dsRNA, 实验组按照 2 μg dsRNA/g 体重的剂量注射 dsRNA, 对照组注射等量生理盐水, 注射部位为第五附肢基部, 每 2 d 注射 1 次, 实验周期为 7 d。实验结束后, 采集眼柄、肌肉、肝胰腺、肠道和血淋巴样品。

1.2 罗氏沼虾 *GLUT1* 基因克隆

按照 TRIpure Reagent (Aidlab)说明书提取罗氏沼虾肝胰腺样品的总 RNA, 1.5%浓度琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, NanoDrop 2000 核酸定量仪检测 RNA 浓度, 按照 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)说明书反转录获得 cDNA 模板。采用 HiScript-TS 5'/3'RACE Kit (Vazyme)试剂盒合成 5' RACE-Ready cDNA 和 3' RACE-Ready cDNA。以罗氏沼虾转录组 *GLUT1* 基因为模板, 采用 Primer Premier 6.0 软件设计引物(表 1), 进行核心片段扩增, 按照 HiScript-TS 5'/3'RACE Kit 试剂盒说明, 进行 5'和 3'RACE。PCR 产物纯化后与 pMD™19-T (TaKaRa)连接, 转入大肠杆菌感受态细胞, 选取阳性单克隆菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果去除载体序列后进行拼接, 获得 cDNA 全序列。

1.3 基因序列生物信息学分析

采用 SeqMan 进行序列拼接, 利用 ORF finder 在线预测开放阅读框(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), 通过 SMART 预测蛋白结构域(<http://smart.embl-heidelberg.de/>), 使用 ProtParam 预测蛋白质的等电点、分子量(<https://web.expasy.org/protparam/>), 通过 Signal 4.0 在线软件预测蛋白的信号肽, 利用 NCBI 的保守结构域(CDD)数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行功能结构域的预测和确定, 在线分析蛋白质二级结构组成(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html), I-TASSER 预测 3D 结构(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), NetNGlyc1.0 (NetNGlyc1.0-Services-DTU Health Tech)预测糖基化位点。

表 1 本研究所用引物序列
Tab. 1 Sequences of primers used in this study

引物名称 primer name	序列 (5'-3') sequence (5'-3')	用途 purpose
GLUT1-F	TCCTCTTCATCTGCCTGCTCCT	核心序列扩增 CDS amplification
GLUT1-R	GCCGTATGCCGATTGCTTGAAT	核心序列扩增 CDS amplification
GLUT1-RT-F	ACAAGACGAAATGGGCGAGATGAG	qRT-PCR
GLUT1-RT-R	TGAAATGACAAGAGGGATGCGAAGG	qRT-PCR
GLUT1-3'GSP1	CATCCCCTGGTTCCTGGTCACTGAGC	3' RACE
GLUT1-3'GSP2	TGAGCTCTTCGCCAGAACGCC	3' RACE
GLUT1-5'GSP1	GGGAGGGTGACAAGTTGGAAGACAGCAG	5' RACE
GLUT1-5'GSP2	GGATGGCAGCAAGGACGGCGAAGA	5' RACE
dsGLUT1-F	CTACTGTATCGGCGGTATGAT	dsRNA 合成 dsRNA synthesize
dsGLUT1-R	TGAGGAGCAGGCAGATGAA	dsRNA 合成 dsRNA synthesize

NCBI 数据库获取甲壳动物及其他物种的 *GLUT1* 氨基酸序列, 使用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对, 采用 MEGA 6.0 软件以 Neighbor Joining 法构建系统进化树。

1.4 *GLUT1* 基因表达分析

根据 *GLUT1* 序列, 设计特异性定量引物 GLUT1-RT-F 和 GLUT1-RT-R, 以 *EF1 α* 为内参基因, 使用 Quant Studio™ PCR 仪检测 *GLUT1* 基因在各组织、葡萄糖注射和 RNA 干扰后的表达情况。qRT-PCR 反应体系 20 μ L: TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNase H Plus) 10 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, 模板 cDNA 1 μ L, ddH₂O 8 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}方法计算 *GLUT1* 基因的相对表达量。

1.5 生化指标检测

将-80 $^{\circ}$ C 保存的血淋巴、肝胰腺和肌肉组织于冰上解冻, 采用南京建成生物工程研究所的试剂盒检测肝胰腺和肌肉中的蛋白质、甘油三酯、海藻糖、糖原含量, 检测血浆中蛋白质、甘油三酯、海藻糖和葡萄糖的含量, 样品前处理、试剂配制和测定步骤严格按照操作说明书进行, 使用 Spark 多功能酶标仪进行测定。

1.6 数据分析

实验数据以平均值 \pm 标准差表示, 采用 IBM SPSS Statistics 20 软件进行单因素方差分析 (ANOVA), 采用 Tukey 氏进行多重比较分析, $P <$

0.05 表示具有显著性差异, 运用软件 GraphPad Prism version 8.4.0 进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 基因序列分析

通过克隆获得罗氏沼虾 *GLUT1* cDNA 序列 (图 1), 命名为 *Mr-GLUT1*, GenBank 登录号为 OQ230279。*Mr-GLUT1* 基因序列全长 1929 bp, 开放阅读框长度 1446 bp, 编码 481 氨基酸, 其中 5' 非编码区(untranslated region, UTR)长 307 bp, 3' UTR 长 177 bp。预测 *GLUT1* 分子量为 52035.73, 等电点为 6.76, 分子式 C₂₄₀₁H₃₈₀₆N₅₈₆O₆₄₅S₂₆, 该蛋白含有酸性氨基酸残基(Asp+Glu)总数为 28, 碱性氨基酸(Arg+Lys)总数为 28, N 末端为甲硫氨酸(Met)。在氨基酸组成中, 亮氨酸占比最高, 达 12.3%, 其次为丙氨酸(10.2%)。*Mr-GLUT1* 基因二级结构中, α 螺旋占 54.05%, 延伸链占 17.88%, β 转角占 3.95%, 无规卷曲占 24.12%。蛋白结构域预测显示其含有 12 个跨膜结构域和 1 个 MFS 功能结构域, 位于第 14~462 位氨基酸。Signal 4.0 分析发现, *Mr-GLUT1* 无信号肽, 为非典型分泌蛋白。NetNGlyc1.0 预测结果表明, 在该蛋白氨基酸序列 47NQTN: 0.5650, 267NPTL: 0.7236, 312NATI: 0.5563, 415NWT A: 0.5907 (均大于阈值 0.5)存在 4 处 N-糖基化位点。

2.2 序列对比和系统进化树分析

将 *Mr-GLUT1* 基因的氨基酸序列和其他物种进行多重序列比对, 结果发现, 十足目(Decapoda)

```
1  acggggcgccagttgcccgtataaacgccccagtgctgatccccgaagcagaggaaggttagtacttgaagaagtagcgtaacttgcccg
91  aagcgcttcaggaacacacgcacataatataacacaaagtctcgagtgttcctggaactcaacggaacagatcggaagaagcag
181 cagtaactctctctcatctgctatctcgactcctctgatcttctctcttctctctttgagccaatcagaactcccttctcgtaaaaaa
      M V I I S I G G F N A R L G F A V A
271 gattttccttttctctgggaataaccgcagcgtcgaaATGGTCATCATCAATAGGGGGTTCAACGCCCGGCTAGGTTTTCGCGTGGCC
19  A A A L G S A F Q H G Y N L G V I N A P Q K L I E N W I N Q
361 GCAGCAGCATTAGGCTCAGCCTTCCAACATGGTACATCTGGGTGTCATCAACGCTCCACAAAAGCTTATCGAAAAGCTGGATCAATCAG
49  F N Y E R H G E Y L T D S V Q T V I I S I M V S I Y C I G G
451 ACCAACTACGAGCGTCATGGTGAATATCTGACGGACTCCGTCCAGACTGTCATCATATCTATAATGGTTTCCATCTACTGTATCGGCGGT
79  M I G G A L T G I F S T R F G R K G G L L V N N V F A V L A
541 ATGATCGGAGGCGCCTTGACTGGAATCTTCTCAACGAGATTCGGACGTAAGGAGGCCCTTCTCGTCAACAATGCTTCGCCGCTCCTTGCT
109 A I L F G F C Q M A N S Y E M I I A A R F V I G I N N G L N
631 GCCATCCTCTCGGATTCGCCAAATGGCCAACTCCACGAGATGATCATAGCCGCTCGATTCGTATCGGTATCAACAACGGTCTGAAC
139 A G L A P M Y L S E I A P T N L R G A I G T V Y Q L V V T I
721 GCGGCTCGCCCTATGTATCTCTCTGAAATCGCCCTACCAAGCTCAGGGAGGCCATTGGTACCGTCTACCGATTGGTGTGACCAT
169 S I L F S Q V M G L D S I L G T E T L W P V L L A L T A I L P
811 TCAATCCTGTTCGCCAGTCTGGGTCGATTCATCTTTGGTACTGAGACACTGTGGCCTGTCTTATGGCCCTGACCTGCCCTGCCCT
199 A V F Q L V T L P I C P E S K F L L I N K D E P M A A Q R
901 GCTGTCTTCAACTTTGTACCCCTCCCATCTGCCAGAGTCGCCAAATTCCTTCATCAACAAGGAGCGCTAGTGTGCCAGCGA
229 A L T W L R D S S N V Q D E M G E M R N E A E A G K L V P S
991 GCCCTTACATGGTTGCGGACTCCTCCAACTACAAGACGAAATGGGGCAGATGAGAAACGAAAGCAGAGGCTGGCAATTTGTCCTCCATCC
259 I S L R E I L S N P T L R I P L V I S M M M M I A Q Q L S G
1081 ATTTCTCTGCGCAATTCGTGTCACCCCAACCCCTTGCATCCTCTTGTGCTTTCATGATGATGATGATGTGCTCAGCACTTTCTGGA
289 I N A V I F F S T K I Y K S A G L S D E A S L N A T I A M G
1171 ATCAACGCTGTTATCTTCTCTACGAGATCTATAAATCAGTGGCTTGAAGACGAGGCTTCCCTGAAGCCACCATCGTATGGGA
319 S M N V L M T V A S L I M V E R F G R K T L M L A G L F G M
1261 TCCATGAACGTGCTCAGCCGCTGCCCTCCCTCATCATGGTCAAGAGTTCGGTTCGCAAAACGCTCATGCTGGCAGGTCTCTCGGTATG
349 L V D V F V L F I C L L L K D T A P W V S Y L S I F L V I L
1351 CTGGTCGAGCTTTCCTCTTCATCTGCCTGCTCCTCAAGACACGCCCTTGGGTACCTCCTCATCTCTCTGGTATCTCT
379 F V V M F A T G P G S I P W F L V T E L F A Q N A R P M A S
1441 TTCTGGTTCATGTCGCGACAGGGCCGGATCCATCCTCCTGTTCCCTGGTCACTGAGCTCTTCCGCGGAGACGCGGCTCCCATGGCCTTC
409 S I A V A V N W T A A F L V G L G F L P I Q E L V G P Y V F
1531 TCCATTGTGTCGCGCTCAACTGGACCGCCGCTTCTTGGTTCGCTGCTGCTTCCCTGCTCAGGAGCTCGTAGGTCCTCATACTGCTTC
439 L I F V V L L A G F I A F T W K K V P E T K G K T I D E I T
1621 CTGATCTTCTGCTGCTCCTGCGAGGCTTCATCGCTCCTGGAAGAAAGTACCTGAACAAAAGGAAAGACGATCGATGAAATCAGC
469 A I F K Q S A Y G A N S V *
1711 GCAATATTCAAGCAATCGGCATACGGCGCAACAGCGCTTGAagaacccccaccaacaccaccacagtcccttaagatttctattatca
1801 aaaaatcagtgattgatactactgatagaagtgatctctatagcaggttcagggttgcctcaatgcaataagcattttgaaa
1891 ccttaaaccttcgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

图 1 罗氏沼虾 *Mr-GLUT1* 全长 cDNA 序列和推导的氨基酸序列

黑色加粗 ATG、TGA 分别表示起始密码子和终止密码子；虚下划线表示 MFS 超家族结构域；

5' UTR 和 3' UTR 用小写字母表示；阴影为 N-糖基化位点。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Mr-GLUT1* cDNA in *Macrobrachium rosenbergii*. Black bolded ATG, TGA indicate start codon and stop codon, respectively. Dashed underscores indicate MFS superfamily structural domains. Lower case letters indicate 5' UTR and 3' UTR. The Shaded indicates N-glycosylation sites.

GLUT1 基因具有较高同源性，罗氏沼虾和克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)氨基酸的同源性最高，达 83.54%，与美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)、日本对虾(*P. japonicus*)、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) 和斑节对虾的同源性分别为 82.29%、80.82%、80.60%和 80.60%。水产动物 *GLUT1* 氨基酸均含有 12 个跨膜结构域，说明 *GLUT1* 的跨膜结构域在进化上高度保守(图 2)。系统进化树显示，节肢动物和脊椎动物明显分为 2 支，罗氏沼虾和其他虾类相似度最高，聚为一支，说明在亲缘关系上较为相近(图 3)。

2.3 *Mr-GLUT1* 在罗氏沼虾组织中的表达特征

采用 qRT-PCR 分析 *Mr-GLUT1* 基因在罗氏沼虾各组织内的相对表达量，结果显示 *Mr-GLUT1* 在检测的 9 个组织中均有表达，肠道中表达量最

高，其次为腹部神经节和心脏，胃中表达量最低(图 4)。

2.4 葡萄糖负荷对 *Mr-GLUT1* 表达的影响

葡萄糖注射后，罗氏沼虾体内葡萄糖和糖原水平发生显著变化：血淋巴葡萄糖水平在注射后 1 h 时达到峰值($P<0.05$)，4 h 基本恢复至对照组水平；肝糖原在 1 h 达到最高值($P<0.05$)，随后逐渐下降，至 8 h 基本恢复正常水平；肌糖原在 4 h 达到最高值，12 h 基本恢复至对照组水平(图 5)。罗氏沼虾体内葡萄糖负荷的增加显著影响了肠道、胰腺和肌肉中 *Mr-GLUT1* 表达：肠道组织中，*Mr-GLUT1* 表达量在葡萄糖注射 2 h 显著高于对照组($P<0.05$)；胰腺在注射 2~12 h 均显著高于对照组水平($P<0.05$)；肌肉在注射 8 h 和 12 h 显著高于对照组($P<0.05$) (图 6)。

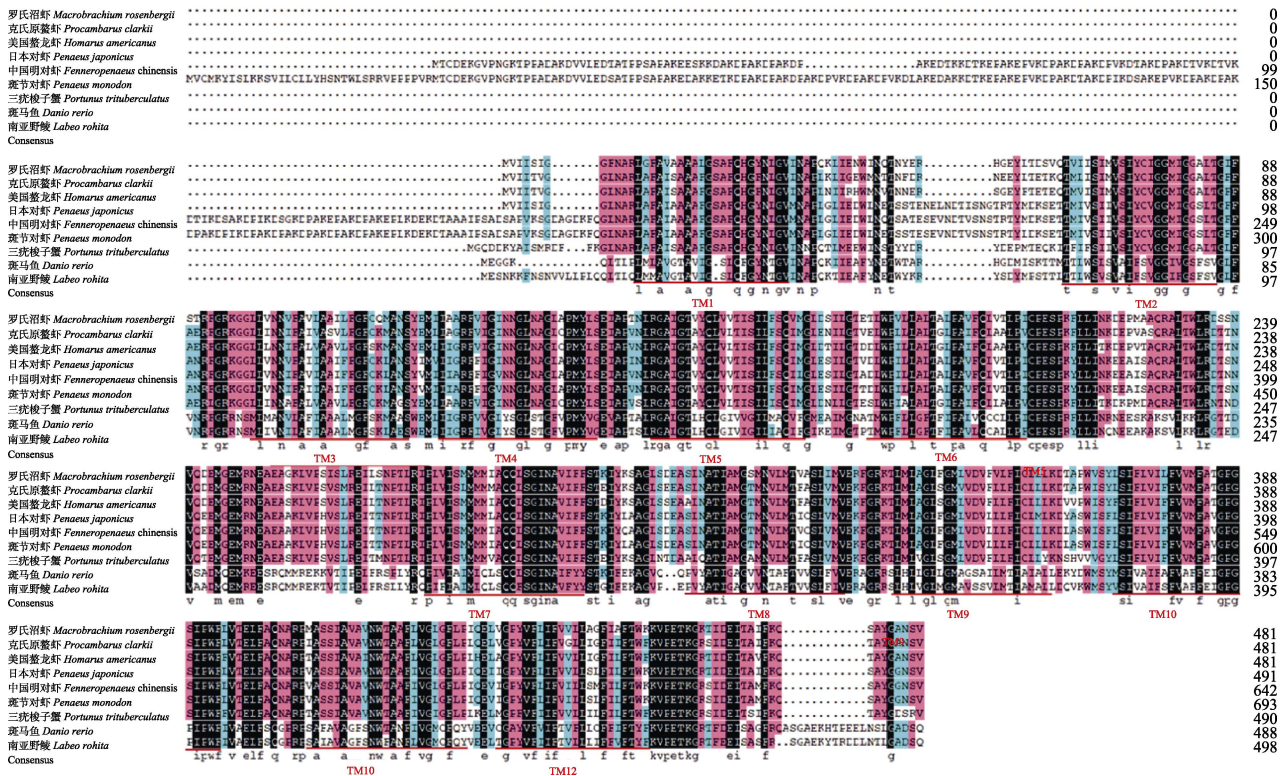


图 2 *Mr-GLUT1* 基因的氨基酸序列与其他物种 *GLUT1* 基因的氨基酸序列比对
 红色下划线为 12 个跨膜结构域; 阴影区表示同源性氨基酸, 其中黑色、粉色、浅蓝色分别表示氨基酸相似性为 100%、75% 以上和 50% 以上。

Fig. 2 Alignment of the amino acid sequences of *Mr-GLUT1* with other species
 Red underline represents transmembrane domains. Shaded area means homology of amino acids, black: similarity=100%, pink: similarity>75%; light blue: similarity>50%.

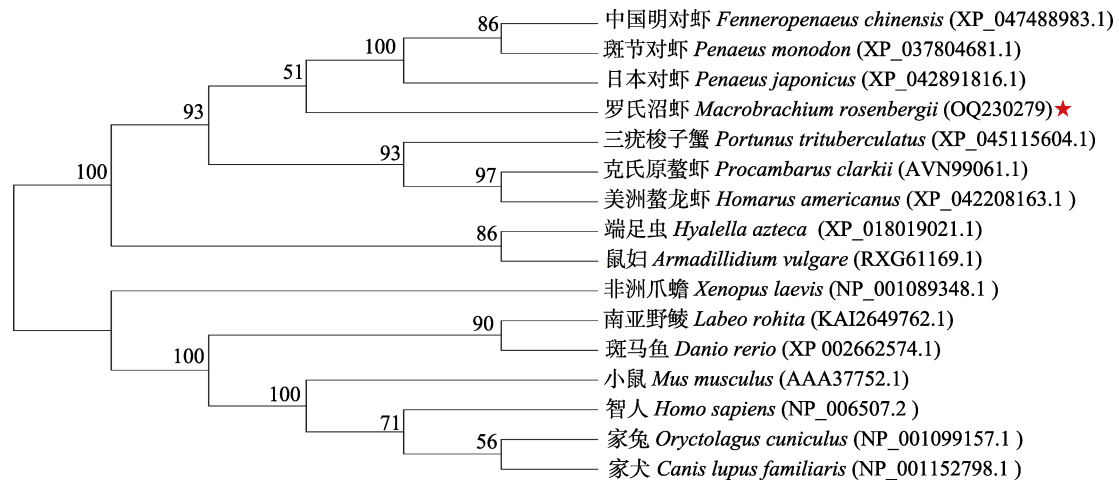


图 3 邻接法构建 *Mr-GLUT1* 基因系统进化树
 Fig. 3 Phylogenetic tree of *Mr-GLUT1* gene by neighbor-joining

2.5 *Mr-GLUT1* 沉默对罗氏沼虾糖代谢的影响

qRT-PCR 显示, 罗氏沼虾眼柄、肠道和肌肉组织中, RNAi 组 *Mr-GLUT1* 表达水平较对照组下

降 75% 以上, 干扰效率明显, 肝胰腺中表达量较对照组无显著差异(图 7)。RNAi 7 d 后, 罗氏沼虾血淋巴中海藻糖和葡萄糖含量显著上升, 而总蛋

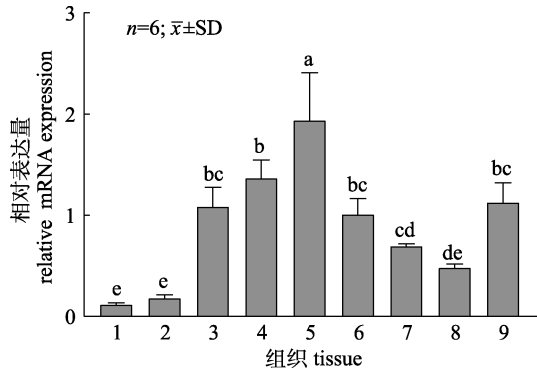


图 4 *Mr-GLUT1* 在罗氏沼虾各组织中的表达水平

1: 胃, 2: 鳃, 3: 脑, 4: 腹神经节, 5: 肠道, 6: 肌肉, 7: 肝胰腺, 8: 眼柄, 9: 心脏; 不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 4 Relative expression of *Mr-GLUT1* in different tissues 1: stomach, 2: gill, 3: brain, 4: abdominal ganglion, 5: intestine, 6: muscle, 7: hepatopancreas, 8: eyestalk, 9: heart. Different letters represent significant differences at 0.05.

白和甘油三酯含量与对照组无显著差异, 肝胰腺糖原、海藻糖、总蛋白和甘油三酯含量与对照组相比均无显著差异(图 8)。

3 讨论

GLUT 蛋白属于主要异化子(major facilitator superfamily, MFS)超家族, 通常具有 12 个跨膜片段, 一个 N 端连接的单一糖基化位点, 和一个较大的中央细胞质连接结构域。本研究获得的罗氏沼虾 *Mr-GLUT1* 基因编码 481 个氨基酸残基, 含有 12 个跨膜结构域和 1 个 MFS(统一正斜体)超家族保守结构, 具有葡萄糖转运蛋白的结构特征。MFS 超级家族蛋白的二级结构中, 12 个跨膜结构域分为 N 端结构域和 C 端结构域^[20], 两个结构域呈现二次膜对称。多重序列对比结果显示, *GLUT1* 氨基酸序列中 TM4 和 TM5 之间存在 EXXXXXXR 基序, 在 TM10 和 TM11 之间也相应存在此基序, 推测可能用于维持蛋白质的构象稳定^[21]。系统进化树结果显示, *Mr-GLUT1* 和其他甲壳类动物高度聚为一支, 表明甲壳类动物 *GLUT1* 在进化上具有保守性, 相似的研究结果在斑节对虾

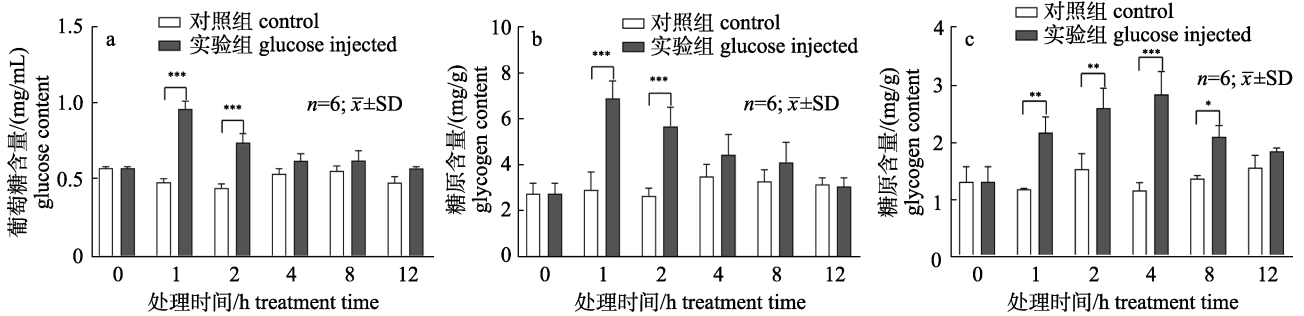


图 5 葡萄糖注射对罗氏沼虾体内葡萄糖和糖原含量的影响

a. 血淋巴, b. 肝胰腺, c. 肌肉。星号表示差异显著, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Fig. 5 Changes of glucose and glycogen content in *Macrobrachium rosenbergii* after glucose injection

a. Hemolymph, b. Hepatopancreas, c. Muscles. Asterisks indicate the significant differences, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

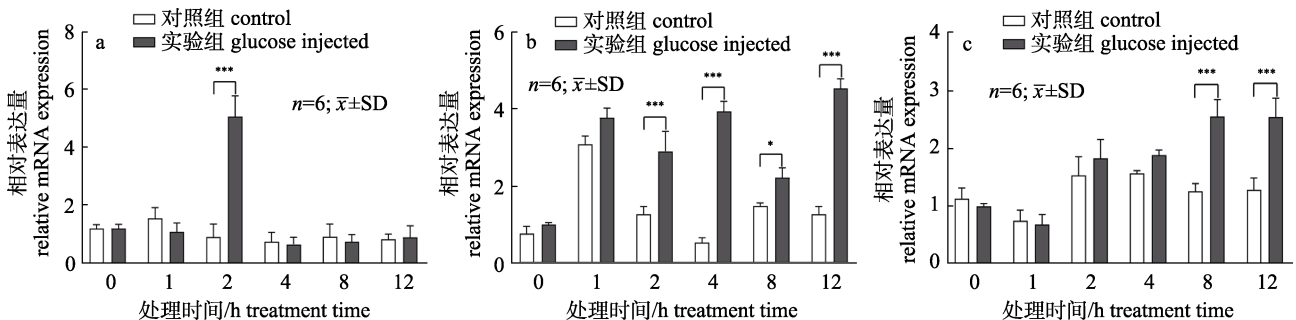


图 6 葡萄糖注射对罗氏沼虾 *Mr-GLUT1* 表达水平的影响

a. 肠道, b. 肝胰腺, c. 肌肉; 星号表示差异显著, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Fig. 6 Expression changes of *Mr-GLUT1* in *Macrobrachium rosenbergii* after glucose injection

a. Intestines, b. Hepatopancreas c. Muscles. Asterisks indicate significant differences, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

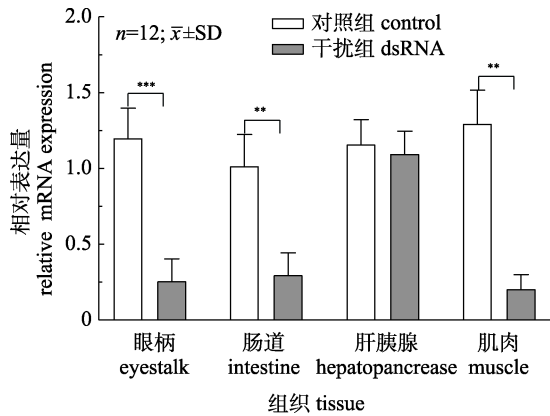


图 7 RNA 干扰后 *Mr-GLUT1* 在不同组织中的表达水平
星号表示显著性差异, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fig. 7 Expression levels of *Mr-GLUT1* in different tissue after RNA interfere
Asterisks indicate the significant differences, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

中^[12]也有报道。

本研究中 *Mr-GLUT1* 在罗氏沼虾各组织中均有表达, 但表达水平存在显著差异, 肠道和心脏

中 *Mr-GLUT1* 表达量最高。基因的组织特异性与组织的功能密切相关^[22], 肠道是食物消化吸收的主要场所之一^[23], 该组织中 *Mr-GLUT1* 基因的高表达水平可能与摄食后葡萄糖的吸收与跨膜运输有关, 当葡萄糖含量激增时, 肠上皮细胞 GLUT1 负责将葡萄糖转运到血淋巴^[24], 进而运输到其他器官, 维持血糖稳态。除肠道外, 心脏是 *Mr-GLUT1* 基因第 2 高表达组织, 心脏为机体高耗能器官, 需要消耗大量葡萄糖氧化供能, *Mr-GLUT1* 在心脏中高表达可能用于满足其对能量的需求, 相似的研究结果在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)中亦有报道^[12,25]。然而, 不同物种 *GLUT1* 基因的组织特异性表达模式存在差异, 例如斑节对虾^[12]和卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)中 *GLUT1* 在鳃组织表达量最高, 金头鲷(*Sparus aurata*)^[26]和大西洋鳕(*Atlantic cod*)^[15]中脑组织表达量最高, *GLUT1* 的组织表达分布具有明显的物种差异性, 造成这些差异性的原因有待研究。

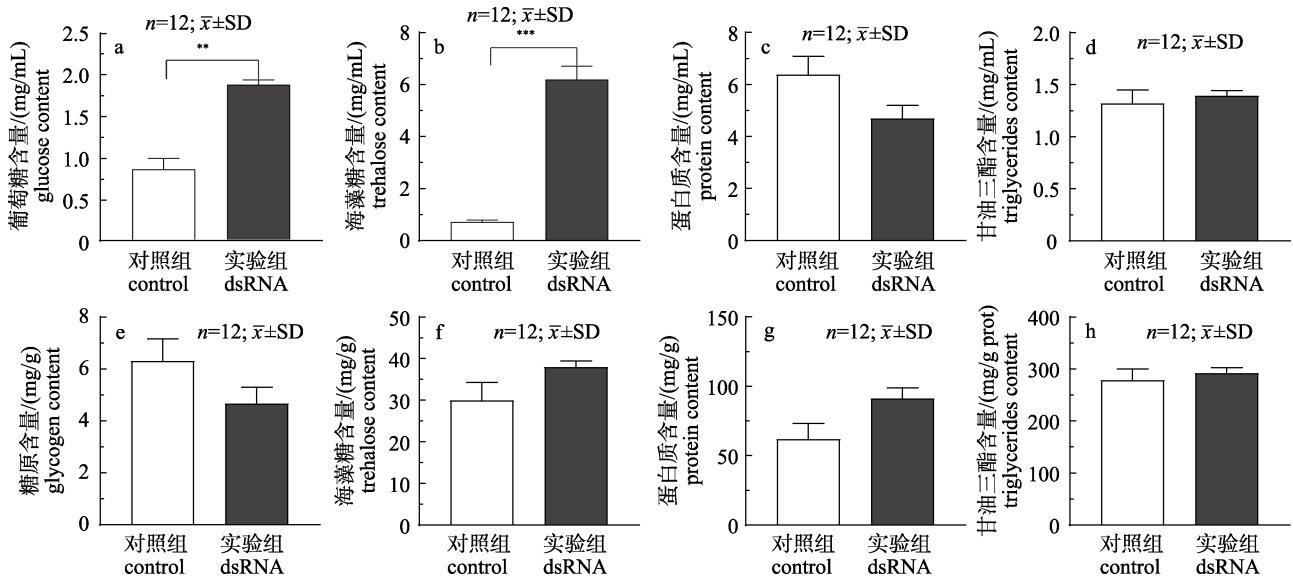


图 8 *Mr-GLUT1* 沉默对罗氏沼虾血淋巴和肝胰腺中生化指标的影响

a, b, c, d: 血淋巴; e, f, g, h: 肝胰腺. 星号表示显著性差异, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fig. 8 Changes of biochemical indices in hemolymph and hepatopancreas of *Macrobrachium rosenbergii* after *Mr-GLUT1* silencing
a, b, c, d: hemolymph; e, f, g, h: hepatopancreas. Asterisks indicate significant differences, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

GLUT1 主要作用是跨膜运输葡萄糖维持血糖平衡, 其表达受血糖水平影响较大^[7]。前人研究发现, 军曹鱼中血液葡萄糖浓度上升可刺激肌肉和血细胞中 *GLUT1* 的表达, 肝脏中表达则无明显影

响^[27]; 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)注射葡萄糖后, 肌肉中 *GLUT1* 表达上调, 其他组织基因表达无明显变化^[28]。本研究发现, 罗氏沼虾葡萄糖注射后, *Mr-GLUT1* 表达量在肠道、肝胰腺和肌

肉中均出现上调趋势,说明高糖水平可刺激多组织 *Mr-GLUT1* 的表达,加速葡萄糖的吸收和转运。然而,不同物种或同一物种不同组织中 *GLUT1* 对高糖刺激的响应情况不一致,推测 *GLUT1* 在维持葡萄糖稳态中的功能可能具有物种和组织差异性。本研究中罗氏沼虾各组织 *Mr-GLUT1* 对葡萄糖负荷增加的响应较为延迟,注射葡萄糖后,血淋巴葡萄糖、肝糖原和肌糖原含量分别在 1、1 和 4 h 达到峰值,而肠道、肝胰腺和肌肉中 *Mr-GLUT1* 分别在 2、2 和 8 h 开始出现上调表达,明显延迟于葡萄糖在机体内的代谢变化,这一研究结果与斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)较为相似,在葡萄糖注射后,斜带石斑鱼血糖在 3 h 达到峰值,而心脏和肌肉 *GLUT1* 基因的表达量分别在 6 和 12 h 达到峰值^[6],推测 *GLUT1* 基因表达的滞后性可能是水产动物葡萄糖不耐受的原因之一。本研究中肠道和肝胰腺组织 *Mr-GLUT1* 对葡萄糖的响应快于肌肉组织,类似的结果在白斑角鲨(*Squalus acanthias*)^[29]中也有发现,虽然肝胰腺和肌肉均为糖原储存的主要场所,但是肝糖原在维持糖稳态中发挥主要作用。

本研究采用 RNAi 沉默罗氏沼虾 *Mr-GLUT1* 基因表达,眼柄、肠道和肌肉组织中沉默效率均在 75%以上,然而肝胰腺中沉默效率较差,相似的结果在凡纳滨对虾中亦有报道^[10],可见 RNAi 的沉默效率具有组织特异性。罗氏沼虾 *Mr-GLUT1* 基因的沉默导致血淋巴葡萄糖和海藻糖含量显著上升,表明 *Mr-GLUT1* 的沉默影响了血淋巴中葡萄糖向靶器官的转运,进一步验证了 *Mr-GLUT1* 对葡萄糖的转运作用。RNAi 对肝胰腺生化成分无显著影响,这与凡纳滨对虾^[10]中 *GLUT1* 基因沉默后肝胰腺中葡萄糖浓度无显著变化的结果相似,推测罗氏沼虾肝胰腺中可能存在其他 *GLUT* 基因负责葡萄糖转运,在哺乳动物中已发现 *GLUT2* 主要负责肝细胞内的葡萄糖转运^[30],罗氏沼虾中是否存在其他 *GLUT* 基因参与葡萄糖转运和糖稳态调控仍需进一步研究。

综上所述,本研究通过基因克隆获得罗氏沼虾 *Mr-GLUT1* 基因,葡萄糖注射实验和干扰实验发现, *Mr-GLUT1* 在糖稳态调节中发挥重要作用,

该结果可为进一步研究罗氏沼虾糖代谢调控机制提供理论依据。

参考文献:

- [1] Chen L Q, Cheung L S, Feng L, et al. Transport of sugars[J]. Annual Review of Biochemistry, 2015, 84: 865-894.
- [2] Joost H, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: Nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members[J]. Molecular Membrane Biology, 2001, 18: 247-256.
- [3] Yan N. A glimpse of membrane transport through structures—advances in the structural biology of the glut glucose transporters[J]. Journal of Molecular Biology, 2017, 429(17): 2710-2725.
- [4] Takata K, Kasahara T, Kasahara M, et al. Erythrocyte/HEPG2-type glucose transporter is concentrated in cells of blood-tissue barriers[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990, 173(1): 67-73.
- [5] Mueckler M. Facilitative glucose transporters[J]. European Journal of Biochemistry, 1994, 219(3): 713-725.
- [6] Mao Y B. Comparative study on sugar tolerance of fish with different feeding habits[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2014. [毛义波. 不同食性鱼类糖耐受能力比较的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014.]
- [7] Zhang W C. Effects of glucose injection on glucose metabolism and glucose transporter gene expression in cobia[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2016. [张武财. 注射葡萄糖对军曹鱼糖代谢和葡萄糖转运蛋白基因表达的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2016.]
- [8] Qiu Y, Huang G J, Liu B S, et al. Cloning of GLUT1 gene from winged pearl oyster *Pteria penguin* and its expression in response to glucose challenge[J]. South China Fisheries Science, 2016, 12(5): 81-89. [邱莹, 黄桂菊, 刘宝锁, 等. 企鹅珍珠贝 GLUT1 基因全长 cDNA 克隆及其对葡萄糖的表达响应[J]. 南方水产科学, 2016, 12(5): 81-89.]
- [9] Yang S, Yan T, Wu H, et al. Acute hypoxic stress: Effect on blood parameters, antioxidant enzymes, and expression of HIF-1 α and GLUT-1 genes in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 67: 449-458.
- [10] Martínez-Quintana J A, Valenzuela-Soto E M, Martínez-Téllez M A, et al. Functionality of the white shrimp glucose transporter 1: Expression in *Xenopus oocytes* and gene silencing during hypoxia[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2016, 474: 109-115.
- [11] Wang X, Li E-C, Xu Z, et al. Molecular response of carbohydrate metabolism to dietary carbohydrate and acute low salinity stress in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*

- mei*[J]. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2017, 17(1): 153-169.
- [12] He P, Jiang S G, Li Y D, et al. Molecular cloning and expression pattern analysis of *GLUT1* in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. South China Fisheries Science, 2019, 15(2): 72-82. [何鹏, 江世贵, 李运东, 等. 斑节对虾 *GLUT1* 基因 cDNA 的克隆与表达分析[J]. 南方水产科学, 2019, 15(2): 72-82.]
- [13] Li S, Li Z, Sang C, et al. Glucose transporters in pearl gentian grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂): molecular cloning, characterization, tissue distribution and their expressions in response to dietary carbohydrate level[J]. Aquaculture Research, 2018, 49(1): 253-264.
- [14] Ren M C. Study on sugar nutrition physiology of cobia and rainbow trout[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012. [任鸣春. 军曹鱼和虹鳟糖类营养生理研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.]
- [15] Hall J R, MacCormack T J, Barry C A, et al. Sequence and expression of a constitutive, facilitated glucose transporter (GLUT1) in Atlantic cod *Gadus morhua*[J]. Journal of Experimental Biology, 2004, 207(26): 4697-4706.
- [16] Fu H T, Jiang S F, Xiong Y W. Current status and prospects of farming the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in China[J]. Aquaculture Research, 2012, 43(7): 993-998.
- [17] Chen W W, Romano N, Ebrahimi M, et al. The effects of dietary fructooligosaccharide on growth, intestinal short chain fatty acids level and hepatopancreatic condition of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) post-larvae[J]. Aquaculture, 2017, 469: 95-101.
- [18] del Carmen González-Peña M, da Glória Blumer Soares Moreira M. Effect of dietary cellulose level on specific dynamic action and ammonia excretion of the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879)[J]. Aquaculture Research, 2003, 34(10): 821-827.
- [19] Fan H D, Li Y D, Yang Q B, et al. Characterization and expression analysis of MKK7 in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different stressors[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(7): 748-758. [范红弟, 李运东, 杨其彬, 等. 斑节对虾 MKK7 基因的克隆及在不同胁迫条件下的表达分析[J]. 中国水产科学, 2020, 27(7): 748-758.]
- [20] Deng D, Yan N. Structural basis and transport mechanism of the major facility superfamily (MFS) transporter[J]. Chinese Science Bulletin, 2015, 60(8): 720-728. [邓东, 颜宁. MFS 超家族转运蛋白结构基础及转运机制[J]. 科学通报, 2015, 60(8): 720-728.]
- [21] Gould G W, Holman G D. The glucose transporter family: Structure, function and tissue-specific expression[J]. Biochemical Journal, 1993, 295(2): 329-341.
- [22] Liu W, Sun Z Q, Xie H W. The progress of gene tissue specificity researches[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2016, 43(1): 5-13. [刘伟, 孙志强, 谢红卫. 基因组组织特异性相关研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2016, 43(1): 5-13.]
- [23] Zhang M L, Shan C J, Du Z Y. Research advances on probiotics and fish gut health[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(1): 147-157. [张美玲, 单承杰, 杜震宇. 益生菌与鱼类肠道健康研究进展[J]. 水产学报, 2021, 45(1): 147-157.]
- [24] Huang Z Y, Wang X Q, Zou S G, et al. Advance in glucose transporters in intestine[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2009, 45(3): 57-61. [黄志毅, 王修启, 邹仕庚, 等. 肠道葡萄糖转运载体研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2009, 45(3): 57-61.]
- [25] Li R, Liu H, Dong X, et al. Molecular characterization and expression analysis of glucose transporter 1 and hepatic glycolytic enzymes activities from herbivorous fish *Ctenopharyngodon idellus* in respond to a glucose load after the adaptation to dietary carbohydrate levels[J]. Aquaculture, 2018, 492: 290-299.
- [26] Balmaceda-Aguilera C, Martos-Sitcha J, Mancera J, et al. Cloning and expression pattern of facilitative glucose transporter 1 (GLUT1) in gilthead sea bream *Sparus aurata* in response to salinity acclimation[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 2012, 163(1): 38-46.
- [27] Ye G L, Zhang W C, Dong X H, et al. Effects of acute hyperglycaemia stress on indices of glucose metabolism and glucose transporter genes expression in cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. Aquaculture Research, 2020, 51: 584-594.
- [28] Hrytsenko O, Pohajdak B, Xu B Y, et al. Cloning and molecular characterization of the glucose transporter 1 in tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 165(2): 293-303.
- [29] Deck C A, Gary Anderson W, Walsh P J. Effects of glucose and insulin administration on glucose transporter expression in the North Pacific spiny dogfish (*Squalus suckleyi*)[J]. General and Comparative Endocrinology, 2017, 247: 46-52.
- [30] Deng D, Yan N. GLUT, SGLT, and SWEET: structural and mechanistic investigations of the glucose transporters[J]. Protein Science, 2016, 25(3): 546-558.

Molecular cloning of *GLUT1* and its function in glucose homeostasis regulation in *Macrobrachium rosenbergii*

XU Wenjing, DING Qianqian, GAO Weifeng, AO shiqi, ZHU Yujie, GAO Xiaojian, ZHANG Xiaojun, JIANG Qun
College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: To explore the function of glucose transporter protein 1 (*GLUT1*) in glucose metabolism regulation in *Macrobrachium rosenbergii*, this study identified a *GLUT1* gene using rapid amplification of cDNA ends and termed *Mr-GLUT1*. The full-length cDNA of *Mr-GLUT1* is 1929 bp with an open reading frame (ORF) of 1446 bp, encoding 481 amino acids. The molecular weight of *Mr-GLUT1* is 52035.73, and the theoretical isoelectric point is 6.76. The results of multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that *GLUT1* is highly conserved in this decapod, with 12 transmembrane structural domains. *Mr-GLUT1* clusters with *Penaeus* in a branch, indicating close genetic relationship. The results of real-time quantitative reverse transcription PCR showed that the *Mr-GLUT1* is widely expressed in all tissues, with the highest expression in the intestine. After glucose injection, the hemolymph glucose level and the glycogen contents in the hepatopancreas and muscle increased rapidly. *Mr-GLUT1* gene expression in intestinal, hepatopancreas, and muscle tissues was also significantly upregulated, but with a delay compared with the hemolymph glucose level. RNA interference silenced *Mr-GLUT1* gene expression with a high efficiency, and glucose content in hemolymph significantly increased. The results of this study suggested that *Mr-GLUT1* plays an essential role in glucose and trehalose transport in *M. rosenbergii*.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; *GLUT1*; gene cloning; glucose metabolism; RNA interference

Corresponding author: JIANG Qun. E-mail: jiangqun1013@163.com