

翘嘴红鲌 PEPCK 基因的克隆和序列分析

戈贤平^{1,2}, 俞菊华², 吴婷婷²

(1. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

摘要:采用 RT-PCR 和 RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)法, 分离和克隆翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)基因的全序列, 得到 2 564 bp[不含 poly(A)]的全长 cDNA, 包括 111 bp 5'非翻译区, 1 911 bp 阅读框以及含 Poly(A)信号 AATAAA 的 542 bp 3'非翻译区[不包括 Poly(A)]。阅读框共编码 636 个氨基酸, 计算的分子量为 69.65 kD。该序列含有 PEPCK 特有的结合草酰乙酸的結構域以及 GTP 三磷酸链和 Mg^{2+} 结合的酶 1 和 2 基序。与其他鱼 PEPCK 的相似性高达 83%~96%, 和爪哇、变形虫等其他动物的相似性为 50%~69%。[中国水产科学, 2006, 13(3): 389~396]

关键词:基因克隆; 快速扩增 cDNA 末端; 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK); 翘嘴红鲌; 序列同源性
中图分类号: Q959.46 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)03-0389-08

翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)生长快, 肉味细嫩又鲜美, 为鱼中上品, 深受人民群众的喜爱。由于天然水域的翘嘴红鲌资源日益减少, 而市场需求不断增加, 人工养殖翘嘴红鲌已在一些地区得到推广。野生翘嘴红鲌是以活鱼为主食的凶猛肉食性鱼类, 而人工繁殖的鱼苗经驯化后可摄食人工饲料^[1]。目前人工饲料中粗蛋白含量高于常见值(38%^[2])。由于饲料中添加碳水化合物作为能量来源可以减少饲料中蛋白质的用量, 从而减少氮的排放, 减轻养殖水体富营养化的程度, 在水产养殖中受到很大重视。为此研究翘嘴红鲌糖代谢相关酶表达量的变化, 并探讨翘嘴红鲌对饲料中碳水化合物忍受或适应程度, 可提供肉食性鱼类糖代谢特性的基础资料, 同时也可今后饲料中添加适宜碳水化合物取代部分蛋白质提供可行性依据。

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK; E. C. 4. 1. 1. 32)是糖异生途径的关键酶, 它可催化乙酰辅酶 A 转化为烯醇式丙酮酸^[3]。其活性主要存在于肝、肾皮质、脂肪组织、空肠和乳腺等组织。研究表明, 在哺乳动物进食含大量糖类的饲料时, 肝中 PEPCK 水平大幅度下降, 禁食或饲以高蛋白低糖日粮时, 则可使其水平提高, 并且 PEPCK 活性的调节主要表现在转录

水平^[4]。但由于鱼类对碳水化合物的利用率不高^[5], 因此对该基因的研究资料仅见于少数几种鱼, 目前已分离克隆了虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[6]、大西洋鲑(*Salmon salar*)^[7]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[8]、黑青斑河豚(*Tetraodon nigroviridis*)、金头鲷(*Sparus aurata*)^[9]、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[9]的 PEPCK cDNA 全序列或部分序列, 并对其序列进行比较, 研究该基因的组织表达特性以及在不同饲料配方情况下的表达^[6]。本研究从翘嘴红鲌肝脏中分离出 PEPCK 基因的 cDNA 全序列, 并对其序列进行了同源性比较和分析, 旨在今后进一步研究该基因在不同营养条件下的表达情况奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

翘嘴红鲌购自浙江淡水研究所试验场繁殖的鱼种 3 尾, 体质量 50 g 左右, 体长约 16.8 cm, 取新鲜肝脏抽提 RNA。

1.2 试剂

抽提 RNA 用 Trizol Reagent(Promega)、反转录酶 M-MLV、*RnaseH*、*TdT* 酶、T4DNA 连接酶、胶回收试剂盒, 均购自 Takara; *Taq* 酶购自 Promega,

收稿日期: 2005-10-27; 修订日期: 2006-01-04。

基金项目: 国家重点基础研究“973”规划项目(2004CB3117401)。

作者简介: 戈贤平(1963-), 男, 研究员, 博士生, 主要从事水产动物营养学研究。E-mail: gexp@ffrc.cn

通讯作者: 吴婷婷。

pUCm-T载体购自上海生工生物工程技术有限公司。

引物设计与合成:用于实验的所有引物如下,其碱基位置根据登录 GenBank 序列(GenBank Accession No.DQ141545)确定。P1、P2 是根据已知鱼类 PEPCK 的保守片段,使用 CodeHop 原理^[10]设计的;P6、P7 是根据 P1、P2 分离得到的序列,使用软件 Primer5.0 设计的用于 PEPCK 基因 3'RACE 的特异引物;P3、P4、P5 是根据 P1、P2 引物分离的片段,设计的用于 PEPCK 基因 5'RACE 的引物。所有引物均由上海申能博彩生物有限公司合成,其中 W=A+T, S=C+G, R=A+G, N=A+C+T+G, Y=C+T, K=G+T。各引物序列如下:

Primer1: 5'-ACC ATG TAT GTG ATC CCC TTC WSN ATG GG-3'(550~578 bp)

Primer2: 5'-CTC CTA CAA ACA CGC CRT GNY KCC A-3'(1 510~1 486 bp)

Primer3: 5'-CAC TGC CGA AGG ATA AGA T-3'(841~823 bp)

Primer4: 5'-GGT GTC TGG GAG ATG TGA G-3'(816~798 bp)

Primer5: 5'-CTG CTA GTT TCT CCA GCA CAG G-3'(694~673 bp)

Primer6: 5'-GGC AAC CAT CTC CAG TAA CAC-3'(1 185~1 205 bp)

Primer7: 5'-GGT GGC AGA AGA CCA GAA GG-3'(1 457~1 438 bp)

1.3 总 RNA 的抽提

取翘嘴红鲌肝脏,用 Trizol Reagent 抽提总 RNA。用变性琼脂糖凝胶电泳溴化乙啶染色显示 28S 和 18S 检测 RNA 的完整性。

1.4 保守片段的分离

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 PEPCK 的部分片段,PCR 反应体系总体积 25 μ L,其中含 5 μ L 10 $\times$ 反应缓冲液,2 μ mol/L Mg-Cl₂, 200 μ mol/L dNTP,引物各 0.4 μ mol/L, 2.5U 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 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分

离,切胶,使用胶回收试剂盒回收,用 T-载体克隆,送阳性克隆测序。根据所测得序列设计特异的 3'RACE 和 5'RACE 引物,分离扩增 PEPCK 的 3'端序列和 5'端序列。

1.5 5'RACE 方法

原理参照文献[11-12],用 5 μ g 总 RNA,以 P3 为引物,用 MMLV 根据使用说明进行 RT 反应,然后加 RnaseH,分解 mRNA,用 DNA 回收试剂盒(Takara)回收 cDNA;再用 TdT 酶在 cDNA 3'端加 poly(A),用试剂盒回收加了 poly(A)尾的 cDNA,以此为模板,用 P4 及 dT-AP(同 3'RACE)为引物,进行 PCR,反应体系同上,反应条件 94 $^{\circ}$ C 3 min,然后 28 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 液稀释 10 倍,取 2 μ L 为模板,用 P5 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、测序。

1.6 3'RACE 方法

参照文献[11-12],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'-CTGATC-TAGAGGTACCGGATCC-3']和 P6 为引物进行 PCR,PCR 总体积 25 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 P7 进行再扩增,退火温度为 55 $^{\circ}$ C,产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离、回收、克隆、测序。

1.7 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。序列分析用软件 DNA-Tools5.1, PEPCK 的氨基酸同源性比较使用 ClustalW1.6^[13]分析,比对结果用 PAUP(Phylogenetic Analysis Using Parsimony version 4.0, b2)^[14]计算系统发育关系,采用 Neighbor-Joining 法,重复 1 000 次,gap 处理为缺失。用 Bootstrap 计算各个分支的支持度。

2 结果

2.1 PEPCK 基因的分离与克隆

使用翘嘴红鲌肝脏总 RNA,用引物 1 和 2 进行 RT-PCR 扩增得到 1 000 bp 左右的 cDNA 片段,经克隆后测序,得到 990 bp 片段,该 cDNA 序列和基因库中已有其他动物的 PEPCK 基因非常相似(E

值为 $1e^{-05} \sim 0$), 从 cDNA 翻译的相应 319 个氨基酸也与已知的 PEPCK 蛋白序列有很高的相似性 (E 值为 $3e^{-108} \sim 0$), 因此确认该片段为翘嘴红鲌 PEPCK 的部分序列。为了获得翘嘴红鲌 PEPCK 全长 cDNA 序列, 根据所得片段设计并合成引物 3、4、5 使用翘嘴红鲌肝脏总 RNA 进行 5' RACE, 获 700 bp 左右条带(图 1), 测序得到 694 bp 的 DNA 片段。设计引物 6、7 按照 3' RACE 实验程序, 结果获得 1 100 bp 左右 DNA 条带, 克隆后测序结果为 1 127 bp。把上述序列拼接得到翘嘴红鲌 PEPCK cDNA 全序列, 该 cDNA 总长为 2 564 bp, 其中阅读框 1 911 bp, 翻译 636 个氨基酸, 推算的蛋白质分子量为 69.65 kD, 3' 非翻译区 542 bp [不包括 poly (A)], 5' 非翻译区 111 bp (图 2)。

2.2 序列分析

使用 ClustalW1.6 把翘嘴红鲌 PEPCK 氨基酸序列与变形虫 (*Dictyostelium discoideum*)、南美白对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、爪蟾 (*Xenopus laevis*)^[8]、斑马鱼 (*Danio rerio*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、黑青斑河豚 (*Tetraodon nigroviridis*)、鸡 (*Gallus gallus*)^[15]、家鼠 (*Mus musculus*) 等 PEPCK 氨基酸序列进行同源性比较, 结果表明, 翘嘴红鲌 PEPCK 氨基酸与斑马鱼同源性高达 96%, 与虹鳟、黑青斑河豚、爪蟾、南美白对虾、鸡、家鼠、变形虫的

同源性分别为 87%、83%、69%、60%、66%、67% 和 50%。经分析发现, 翘嘴红鲌 PEPCK 和所有脊椎动物 PEPCK 一样, 具有与草酰乙酸结合的 PEPCK 特有结构域以及与 GTP 三磷酸链结合的激酶 1 和激酶 2 基序(图 3)。由图 3 可见, PEPCK 特有结构域不仅在脊椎动物中一致, 在属于节肢动物的南美白对虾以及属于原生动物的变形虫中都有, 因此, 在进化中相当保守; 而激酶 1 和激酶 2 基序的保守性则没 PEPCK 特有结构域强, 南美白对虾有激酶 2 基序, 但变形虫则有激酶 1 基序。

使用上述比对结果, 用 PAUP 计算系统发育关系, 在总共 674 个位点中, 200 个位点(包括第 1~94 个, 421~440, 587~674)由于处于变化较大的区域无法判断这些区域之间有同源性, 而被排除在系统发育关系之外, 采用 Neighbor-Joining 法, 重复 1 000 次, gap 处理为缺失, 构建了系统发育树(图 4), 上标数据为 Bootstrap 值即各个分支支持度。图中可见爪蟾、黑青斑河豚、虹鳟、斑马鱼和翘嘴红鲌以 bootstrap 值为 74 的支持度形成 1 个分支, 鸡和家鼠以 bootstrap 值为 100 的支持度形成 1 个分支, 但这 2 个分支和南美白对虾及变形虫之间的关系由于 bootstrap 值低于 50 而不能确定的, 说明他们之间相似性比较低。

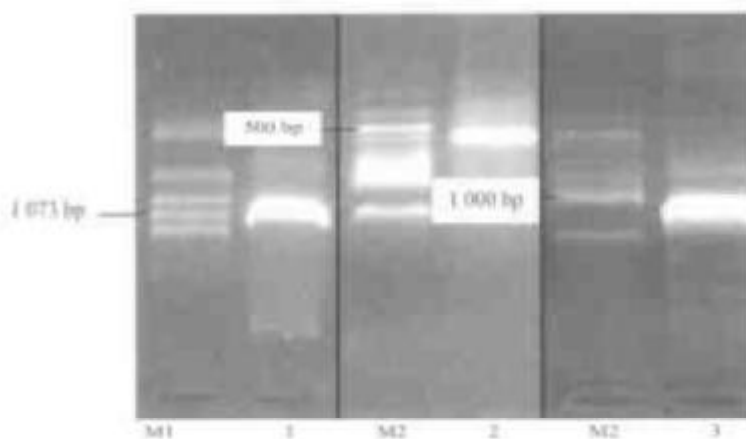


图 1 RT-PCR 和 RACE 结果

M1: ϕ x174 *Hae* III digest; M2: marker DL2000; 1: 引物 1 和 2 扩增片段; 2: 引物 5 和 AP 扩增片段; 3: 引物 7 和 AP 扩增片段

Fig.1 The results of RT-PCR and RACE

M1: ϕ x174 *Hae* III digest; M2: marker DL2000; Lane 1: the fragment of P1 and P2; Lane 2: the fragment of P5 and AP; Lane 3: the fragment of P7 and AP

1	CGA CTC TCT TCA GTG TGA TAT GAG AGG TGC ACA GGA CTG AAG AGG AAC AAG CCA CCC CTC	60
61	TCA TAT TGC TTT ATT TTA TTG TTT ACT CCA CCA ATT TCA CTT GCA CCA AAG ATG TCC TGC	120
1		
121	TTG TTG CTT GGA GTA CTG AGG AGG CGA AAT GGC ATC AGT ACA GCT TCA GTG GGA GCG CCG	180
4	L L L G V L R R R N A I S T A S V G A R	23
181	TCC CTC GCC TCC ATT CCC TCT CTG CCC TCG TCA GTG GCT GAC TTT GTG TCT GGC GCA GTG	240
24	S L A S I P S L P S S V A D F V S G A V	43
241	GCT GAG TGT AAA CCT GCT AAA GTG CAC GTG GTC ACA GGC ACA CCA GAG GAG ACG GCA GAC	300
44	A E C K P A K V H V V T G T P E E T A D	63
301	ATC CTG GCC AAC CTC GAG AAA GAG GGC ATG GTA AAG AAA CTC AGC AAA TAT GAA AAC TGC	360
64	I L A N L E K E M V K L S K Y E N C	83
361	TGG CTG GCA CGT ACT GAC CCT AAA GAT GTG GCT CGT GTG GAG AGT AAG ACA GTG ATC GTC	420
84	W L A R T D P K D V A R V E S K T V I V	103
421	ACG AAG AAC CAA AGA GAC ACT ATC CCC ATC CCC GGC GGA GGT GCT AAG TCC CAG CTG GGC	480
104	T K N Q R D T I P I P A G G A K S Q L G	123
481	AGC TGG ATG AGT GAG CGA GAC TTC CAG AAA GGC AGA GAG GAC GGC TTT CTT GGC TGC ATG	540
124	S W M S E R D F Q K A R E D R F P G C M	143
541	GCA GGA GGC ACT ATG TAC GTG ATT CCC TTC AGT ATG GGC CCC GTG AAC TCT TCT CTT GCT	600
144	A G R T M Y V I P F S M G P V N S S L A	163
601	AAG TTT GGT GTT CAG GTG ACA GAT TCT CCA TAT GTG GTG GCT AGC ATG GGC ATC ATG ACA	660
164	K F G V Q V T D S P Y V V A S M G I M T	183
661	CGC ATG GGC ACA CCT GTG CTG GAG AAA CTA GCA GAG GGC GGC GAG TTT GTG CGC TGC GAC	720
184	R M G T P V L E K L A E G A E F V R C Q	203
721	CAC TCT TTG GGC CGA CCT TTA CCA CTG AAA GCT CCT TTA GTA AAC AGC TGG CCT TGT AAC	780
204	H S L G R P L P L K A P L V N S W P C N	223
781	CCA GAG AAG GTG TTG ATC TCA CAT CTC CCA GAC ACC AGG CAG ATC TTA TCC TTC GGC AGT	840
224	P E K V L I S H L P D T R Q I L S F G S	243
841	GGT TAC GGT GGA AAC TCG CTC CTT GGA AAG AAG TGC TTT GCT CTT GGT ATC GGC TCA GGC	900
244	G Y G G N S L L G K K C F A L R I A S R	263
901	ATC GGC AAA GAC GAA GGC TGG TTG GCT GAA CAC ATG CTG ATT CTC GGA ATC ACA AAT OCT	960
264	I A K D E G W L A E H M L I L G I T N P	283
961	CAA GGA GTA AAA CGG TAC ATT GCA GCA GCG TTC CCG AGC GCT TGT GGG AAA ACT AAC CTG	1020
284	Q G V K R Y I A A A F P S A C G K T N L	303
1021	GCC ATG ATG AAA CCA GCA CTG CCA GGC TGG AAG GTT GAA TGT GTG GGC GAT GAC ATC GGC	1080
304	A M M K P A L P G W K V E C V G D D I A	323
1081	TGG ATG AAA TTT GAC AGT CAG GGT AAA CTT AGA GCT ATT AAT CCA GAG AAT GGT TTC TTT	1140
324	W M K F D S Q G K L R A I N P E N G F F	343
1141	GGA GTT GCC CCG GGC ACG TCC CTT AAG ACC AAC OCT CAT GGC ATG GCA ACC ATC TCC AGT	1200
344	G V A P G T S L K T N P H A M A T I S S	363
1201	AAC ACA GTG TTC ACT AAC GTA GGA GAG ACC AGC GAT GGG GGG GTT TGG TGG GAG GGT CTG	1260
364	N T V F T N V G E T S D G G V W W E G L	383
1261	GAT CCA OCT GCA CCA GGA ATC AAA CTC ACA GAC TGG CAC GGC AAA TCT TGG AAG TAT GGT	1320
384	D P P A P G I K L T D W H G K S W K Y G	403
1321	GAT TCT ACA CTG TGC GCT CAC CCG AAC TCC AGG TTT TGT GGC OCT GCT GGC CAG TGC OCT	1380
404	D S T L C A H P N S R F C A P A G Q C P	423
1381	ATC ATA GAC CCA CTC TGG GAG AGT GAT GAG GGC GTC CCT ATT GAT GGC ATT GTA TTT GGT	1440
424	I I D P L W E S D E G V P I D A I V F G	443
1441	GGC AGA GCA CCA GAA GGT GTG OCT TOG GTG TAT GAG TCA TTT AAC TGG GGC CAT GGT GAT	1500
444	G R R P E G V P S V Y E S F N W R H G V	463
1501	TTT GTG GGT GCA GGC ATG AGA TCT GAA TCC ACG GGC GCT GCG GAA CAT AAA GGT AAA GTA	1560
464	F V G A A M R S E S T A A A E H K G K V	483
1561	ATC ATG CAT GAC CCC TTC GCA ATG CGT CTT TTC GGC TAT AAC TTT GGC GAC TAT CTG	1620
484	I M H D P F A M R P F F G Y N F G D Y L	504
1621	GCC CAC TGG TTG AGT ATG GAG AAG CCC AAA GGC CCG ACC CAG CTC OCT AAG ATC TTC CAT	1680
504	A H W L S M E K R K G P T Q L P K I F H	523
1681	GTC AAC TGG TTC CCG AAA GAT CAG AAG ACC GGC TCT TTC CTG TGG CCA GGC TTT GGA GAG	1740
524	V N W F R K D Q K T G S F L W P G F G E	543
1741	AAC GGC GGT GTC CTC GAG TGG ATC TTC AAA CGA TGT GGC GGT ACC AGT GAA GAA GAG GCT	1800
544	N A R V L E W I F K R C G R T S E E E A	563
1801	GCC ACC AAG AGC ATT GTG GCA TGG ATT CCA CAA AAC GGT GGC ATA AAC ACA GAA GGC CTG	1860
564	A T K S I V G W I P Q N G A I N T E G L	583
1861	GGT GGG AAC ATC GAT ATG GGT GGC CTC TTT GAC CTG CCC AAA CCC TTC TGG CAA AAG GAA	1920
584	G G N I D M G A L F D L P K P F W Q K E	603
1921	ACA CAG GAG CTT CCG ACC TAC TTC ACC CAG CAG GTT GGA GCT GAT CTA CCT GCA CAA GTG	1980
604	T Q E L R T Y F T Q Q V G A D L P A Q V	623
1981	GAA GGA GAG CTG AGG GCG CTG GAG GAG AGA GTT AGG GAT TGA ACA GAC GAC GCT ACA TTA	2040
624	E G E L R A L E E R V R D *	636
2041	CAT TGA TGT GAG TAA TGT GAG GAA TAA GAT TGG TTG AGG TGG AAG TAA CTG TTT TAA TGT	2100
2101	GAG TAA CTG TTG CAC TGC AGT GGA CAC TGC ATC TGA GAA ATA CAA AAC CAA AAA GTT CAC	2160
2161	TAG ATG CCA TCA GTG GTA TCA ATT CCA AGT GGC TTG TTT TAT CTT AAA GTA AAA GCT AAA	2220
2221	AGC TCT ATT TAA TGT TTA CAA ACT ATC TAG CAA AAT GGC ATT TTA GAT TAT TTT CAG TTC	2280
2281	AGA CAA GAC CAC ATG ATG AAT TTA AAC CAA AAT ATC TTA AAA AAT TCT TTA TGA GTA CAC	2340
2341	TAC CTA TTA TAA GCA CCA ATA TCA TCA TTT GTA CTT GGT ACC TTA TGA ACA CCG AAT TTT	2400
2401	TAT TTC CAA AGA ATT TGC CTT GTG TTG GTG ATT CAG ATT GTA ATA TGA TTG ACA TGA TTC	2460
2461	GGG TTG AGC TAG GGT TGA AGA ATC TGG ACC AAA GAG TAC CAA AGA GTC TCA GTC AAT GAA	2520
2521	TGT GTG TAT GTT TTT ACC TGA GCT GAC TGA ATA AAT ATA ACT CT2.564	

图2 翘嘴红鲮 PEPCK 全长 cDNA 序列及翻译的氨基酸序列

阅读框 1911 bp 编码 636 个氨基酸, poly(A) 加尾信号用斜体表示。

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *E. ilishaeformis* PEPCK cDNA. The 1911 bp ORF encodes a protein of 636 amino acids in length. Poly(A) signal indicated in italic.

3 讨论

PEPCK 属于包括 L-丙酮酸激酶 (E.C.2.7.1.40)、葡萄糖激酶 (E.C.2.7.1.1) 和脂肪酸合成酶 (E.C.2.3.1.85) 等在内的一个酶家族,在哺乳类动物中,他们的表达受日粮中碳水化合物含量的影响^[16-17],是动物对碳水化合物消化利用的一个指示^[18]。本研究分离得到了翘嘴红鲌肝脏 PEPCK cDNA 全序列,通过序列比对分析得知,所分离克隆的翘嘴红鲌 PEPCK 与其他鱼的 PEPCK 相似性很高(83%~96%),和鸡及鼠的同源性也高达 66% 和 67%,并具有 PEPCK 特有的和草酰乙酸结合的結構域,以及与 GTP 三磷酸链和 Mg^{2+} 结合的激酶 1 和 2 基序(图 2),因此认为是具有功能的酶,序列比对结果还说明该酶在进化中相当保守。

该酶一般以 2 种形式存在(线粒体和细胞质),它们的表达具有差异^[3]。虽然由 Signal IP 方法可判定分离到的翘嘴红鲌 PEPCK 在氨基端具有 36 个氨基酸组成的线粒体靶序列。但由于没测定该基因在不同条件下的表达,因此单从序列很难判定其为线粒体型还是细胞质型。另外,从对肉食性虹鳟^[6]、大西洋鲑^[7]和鲈鱼^[19]的研究结果发现,在这些肉食性鱼类中,该基因的表达与饲料中碳水化合物含量无关。鱼体内的葡萄糖是由非碳水化合物产生的,而体内持续内源性葡萄糖的生成使虹鳟等肉食性鱼对饲料中碳水化合物利用率降低。对鲤鱼^[9]的研究显示,该酶在摄食后的 6 h 和 24 h 表达没变化,投喂含碳水化合物饲料比不含碳水化合物饲料该基因的表达有所降低,但差异不显著。有关不同碳水化合物对翘嘴红鲌 PEPCK 酶的表达变化正在研究中。

参考文献:

- [1] 侯冠军,李海洋,蒋业林. 翘嘴红鲌生物学特性及其资源利用的探讨[J]. 安徽农业科学,2004, 32(4):754-755.
- [2] 陈建明,叶金云,潘 西,等. 翘嘴红鲌鱼种对八种蛋白质饲料原料的消化率[J]. 淡水渔业,2005, 35(1):20-22.
- [3] Matte A, Tari L W, Goldie H, et al. Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxylase[J]. J Biol Chem, 1997, 272, 8:105-8:108.
- [4] Hanson R W, Roskel L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase(GTP) gene expression[J]. Annu Rev Biochem, 1997, 66: 581-611.
- [5] Wilson R P. Utilisation of dietary carbohydrate by fish[J]. Aquaculture, 1994, 124: 67-80.
- [6] Parnier S, Plagnes-juan E, Breque J, et al. Hepatic phosphoenolpyruvate carboxylase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. J Exp Biol, 2001, 204: 359-365.
- [7] Trunulis M A, Dregni O, Cristophersen B, et al. A glucokinase-like enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 114B: 35-39.
- [8] Strausberg R L, Feingold E A, Grouse L H, et al. Generation and initial analysis of more than 15 000 full-length human and mouse cDNA sequences [J]. Proc Natl Acad Sci U. S. A., 2002, 99(26):16 899-16 903.
- [9] Parnier 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] 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): 1 628-1 635. <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html>.
- [11] Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligo-nucleotide primer [J]. Proc Natl Acad Sci U. S. A., 1988, 85:8 998-9 002.
- [12] 俞菊华,夏德全,杨 弘,等. RACE 法分离团头鲂生长激素全长 cDNA 及其序列测定 [J]. 水产学报,2003, (27)6:533-539.
- [13] Thompson J D, Higgins D G, Gibson J F. Clustal W:improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22:4 673-4 680.
- [14] Swofford D L. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods [M]. Version 4, Sunderland: Sinauer Associates, 1998.
- [15] Cook J S, Weldon S L, Garcia-Ruiz J P, et al. Nucleotide sequence of the mRNA encoding the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxylase (GTP) from the chicken [J]. Proc Natl Acad Sci U. S. A., 1986, 83(20):7 583-7 587.
- [16] Pilakis S J, Granner D K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis [J]. Annu Rev physiol, 1992, 54:885-909.
- [17] Girard J, Ferre P, Foufelle F. Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes [J]. Annu Rev Nutr, 1997, 17:325-352.
- [18] Parnier S, Plagnes-Juan E, Kaushik S. Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. J Exper Biol, 2001, 204:2 351-2 360.
- [19] Børrebaek B, Cristophersen B. Hepatic glucose phosphorylation activities in perch (*Perca fluviatilis*) after dietary treatments [J]. Comp Biochem Physiol, 2000, 125B: 387-393.

Molecular cloning and character analysis of cDNA of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in *Erythroculter ilishaeformis*

GE Xian-ping^{1,2}, YU Ju-hua², WU Ting-ting²

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK; E. C. 4. 1. 1. 32) can catalyse the conversion of oxaloacetate to phosphoenolpyruvate and is an important rate-limiting enzymes involved in hepatic gluconeogenesis. A hypothesis to explain the poor utilisation of dietary glucose by fish is a persistent highly active hepatic glucose production even when the fish were fed with high levels of carbohydrates diets. In mammals, the gluconeogenic enzymes generally correlate with the amount of the corresponding mRNAs and there is decreased gene expression for these hepatic enzymes by feeding carbohydrates. Research revealed gluconeogenic enzymes in rainbow trout is not regulated by carbohydrates. *Erythroculter ilishaeformis* is a species of carnivorous fish, but in artificial aquaculture situation it can eat carbohydrates feed. Whereas there is no information about gluconeogenic enzymes of *Erythroculter ilishaeformis*. Here isolation and cloning of the PEPCK were conducted by using RT-PCR and RACE in *Erythroculter ilishaeformis*. The cDNA was 2 564 bp with 111 bp 5'UTR, 542 bp 3'UTR(excluding poly(A)) and 1 911 bp ORF, which encoded 636 amino acids and had a predicted mol wt of 69.65 kD. The *Erythroculter ilishaeformis* PEPCK appears to possess the PEPCK-specific domain to bind oxaloacetate as well as kinase-1 and kinase-2 motifs to bind the GTP triphosphate chain and Mg^{2+} , respectively. For phylogenetic analysis the deduced amino acid sequence of *Erythroculter ilishaeformis* PEPCK, together with PEPCK sequences reported for other vertebrate and invertebrate species, were aligned by ClustalW, version 1.6. The results revealed the *Erythroculter ilishaeformis* PEPCK shared 83% – 96% sequence identity with those of *Tetraodon nigroviridis*, rainbow trout and zebrafish, the closest being zebrafish, and shared 50% – 69% identity with clawed frog, amoeba, chicken and mouse. But the percent age of identity/similarity was high in the region of PEPCK specific domain, kinase 1 and kinase2 motifs. This confirms that this sequence corresponds to a functional enzyme. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3):389 – 396]

Key words: gene cloning; rapid amplification of cDNA ends; phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK); *Erythroculter ilishaeformis*; sequence homology

Corresponding author: WU Ting-ting.