

DOI: 10.12264/JFSC2022-0303

## 中华蛸糖代谢相关基因克隆及表达分析

陈小灵<sup>1</sup>, 孙玉龙<sup>2</sup>, 朱友芳<sup>3</sup>, 张子平<sup>2</sup>, 王艺磊<sup>1</sup>

1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;
2. 福建农林大学海洋学院, 福建 福州 350002;
3. 莆田市水产科学研究所, 福建 莆田 351100

**摘要:** 头足类的养殖主要依赖于天然饵料, 目前无人工配合饲料可用, 这一问题成为其发展大规模养殖的制约因素, 研究中华蛸(*Octopus sinensis*)的糖代谢模式可为其配合饲料中碳水化合物的添加比例提供参考依据。本研究克隆了中华蛸葡萄糖-6-磷酸异构酶(glucose phosphate isomerase, GPI)、磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, PGK)和丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK) 3个糖代谢酶的相关基因, 并对其表达进行了检测。结果显示, 中华蛸 *OsGPI* 的开放阅读框(open reading frame, ORF)1725 bp, 编码 574 个氨基酸; *OsPGK* 的 ORF1248 bp, 编码 415 个氨基酸, *OsPK* 的 ORF1683 bp, 编码 560 个氨基酸。qRT-PCR 结果显示, 这 3 个基因在不同组织/器官中均有表达, 但在脑、消化腺和后唾液腺中的表达水平最高。3 个基因在胚胎不同发育时期皆有表达, 总体趋势是初孵幼体的表达量高于多细胞期。在幼体饥饿胁迫过程中, 随着饥饿时间的推移, 3 个基因在饥饿 2 d 后的表达水平显著降低, 紧接着在饥饿 3 d 和 4 d 后表达水平显著升高, 最后在饥饿 5 d 后的表达水平开始回落并降低。在投喂配合饲料(compound feeds)、锐齿螭(*Charybdis acuta*)和沙丁鱼(*Sardina pilchardus*)的实验中, 与投喂 0 d 相比, 配合饲料组和沙丁鱼组在投喂 21 d 后, *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 在中华蛸消化腺的表达均有不同程度的升高, 在投喂 42 d 后, *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 的表达量出现不同程度的回落。锐齿螭组在投喂 21 d 和 42 d 后, *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 的表达量相较于投喂 0 d 时的均显著升高。*OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 在胚胎发育、饥饿和不同饲料投喂过程中的表达模式说明其参与了中华蛸糖代谢过程的调节, 本研究可为中华蛸饲料的选择和配合饲料中碳水化合物的添加提供基础数据。

**关键词:** 中华蛸; 糖代谢; 饥饿; 饲料; 表达分析

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)12-1738-12

糖酵解(glycolysis)是动物体内葡萄糖分解的唯一途径, 在能量生产和代谢稳态中起着重要作用<sup>[1]</sup>, 糖异生(gluconeogenesis)是限制膳食中的碳水化合物供应下葡萄糖稳态的关键合成代谢调节途径<sup>[2]</sup>。糖酵解和糖异生催化相反的代谢反应, 是生存所必需的<sup>[3]</sup>, 相关通路已被证明参与到了头足类动物能量代谢的反应过程<sup>[4]</sup>。葡萄糖-6-磷酸异构酶(glucose phosphate isomerase, GPI)是参与糖酵解和糖异生的重要酶类, 在生物体内行使多

种功能<sup>[5-6]</sup>。磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, PGK)在碳水化合物的代谢过程中发挥重要作用, 该酶的缺乏可引起生物体代谢等功能的紊乱<sup>[7]</sup>。丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)是糖代谢限速酶之一, 其活性的强弱可表明糖酵解的发生程度<sup>[8]</sup>。

中华蛸(*Octopus sinensis*)隶属于软体动物门(Mollusca), 头足纲(Cephalopoda), 八腕目(Octopoda), 蛸科(Octopodidae), 蛸属(*Octopus*)。曾被认为是真

收稿日期: 2022-09-24; 修订日期: 2022-10-12.

基金项目: 福建省科技计划项目(2022N0035); 福建省科技计划项目(2022T3028).

作者简介: 陈小灵(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产养殖. E-mail: 1371004017@qq.com

通信作者: 王艺磊, 教授, 研究方向为水产动物生理学. E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

蛸(*O. vulgaris*)的同物异名<sup>[9]</sup>。中华蛸是我国重要的经济头足类动物之一<sup>[10]</sup>,其生长速度快,在水产养殖上具有很大的发展潜力<sup>[11]</sup>。在人工育苗过程中,中华蛸幼体开口饲料目前尚未明确,导致其幼体生长缓慢,死亡率高;同时有研究表明营养缺乏和营养成分不平衡是限制头足类动物生存和生长的重要原因<sup>[12]</sup>。目前,头足类的养殖主要依赖于天然饵料,没有人工配合饲料可用成为对其开展大规模养殖的制约因素。糖类是机体生长发育的三大营养物质之一,对头足类商乌贼(*Sepia officinalis*)的代谢分析研究表明,长期饥饿条件下商乌贼组织中的糖酵解能力降低,消化腺中PK酶的活性下降了95%,这可能与机体为维持生命活动所保存的适量可用的葡萄糖相关<sup>[13-14]</sup>。

Akagi 等<sup>[15]</sup>的研究表明,头足类动物获取能量的主要生化途径是糖异生,表明糖异生在头足类动物能量代谢中的关键作用。Sun 等<sup>[16]</sup>的研究表明,中华蛸随着饥饿时间的延长,机体开始利用蛋白质和脂类物质,糖异生代谢途径作为蛋白质和脂质向糖类转化过程中的关键途径在此时变得活跃。同时有研究表明饲料中适宜的糖类含量能够调节糖酵解和糖异生关键酶的活性及表达<sup>[17]</sup>。目前中华蛸糖代谢的研究相对薄弱,糖代谢在发育和生长过程中的作用的研究有待深入。本研究克隆了与中华蛸糖代谢相关的 *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 基因,并分析其不同组织/器官中、胚胎的不同发育时期、幼体不同饥饿时间及其在投喂 3 种不同饲料情况下的表达模式,结果有助于了解中华蛸糖代谢机制,为中华蛸饲料的选择及配合饲料中碳水化合物的添加提供参考资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

实验用中华蛸组织样品于 2021 年 7 月采自福建省莆田市南日海区的野生个体,平均体重为(0.52±0.1) kg。采集肌肉、脑、鳃、鳃心、消化腺、小肠、后唾液腺、肾脏、眼、心脏等 10 个组织/器官,用于中华蛸糖代谢相关基因 *GPI*、*PGK*、*PK* 的克隆及其表达研究。

胚胎不同发育时期的样品采自莆田新丰水产

有限公司南日岛海区的网箱,母蛸在产卵巢中产卵并护卵,自然水温孵化,孵化水温 14.7~20.8 °C,分别采集多细胞期、红珠期、黑珠期和初孵幼体 4 个时期的胚胎,每个时相取 6 份样品储存于液氮中。

幼体饥饿胁迫实验的采样时间为 2019 年 5 月,实验水温为(22.5±0.5) °C,实验水体 100 L,设置 3 个平行组,每组放养刚孵出的中华蛸幼体 1000 只。将中华蛸幼体出膜时间定义为 0 h,不投喂饵料,饥饿天数分别为 0 d、1 d、2 d、3 d、4 d 和 5 d,每个时相取 100 只储存于液氮中。

投喂的饲料种类是影响中华蛸成活率和生长率的重要因素,蛸类饲料类型包括低值蟹类、杂鱼虾和贝类,国内外也已研究了多种类型的人工配合饲料用于投喂,但比较生长及存活率结果后发现,人工配合饲料的效果不如天然饵料<sup>[18]</sup>。因此本实验根据实际养殖情况,选择配合饲料(compound feeds)、锐齿螭(*Charybdis acuta*)和沙丁鱼(*Sardina pilchardus*) 3 种饲料进行投喂。3 种饲料投喂试验在莆田新丰水产有限公司南日岛海区的网箱进行,野生中华蛸平均体重为(1.27±0.06) kg,随机分配饲养在 3 口规格为 3.0 m×3.0 m×2.5 m 的网箱中,每箱放养 150 只,并在网箱四周上缘朝水平方向加一圈宽约 15 cm 的防逃网片。从 2021 年 11 月 14 日开始投喂并采样,分别投喂配合饲料、锐齿螭及沙丁鱼,投喂 0 d、21 d 以及 42 d 时采集消化腺组织,置于液态氮中。

### 1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

总 RNA 提取参照试剂盒说明书进行(Trizol<sup>®</sup> Reagent, ThermoFisher, 上海)。琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, NanoDrop-1000 检测 RNA 的浓度和纯度。取 1 μg 总 RNA 进行反转录,反应参照试剂盒说明书进行(SuperScript<sup>™</sup> III, ThermoFisher, 上海),保存于-20 °C 备用。

### 1.3 中华蛸 *GPI*、*PGK* 和 *PK* 基因克隆

对本课题组已有中华蛸转录组数据库进行筛选,获得 *OsGPI*、*OsPGK*、*OsPK* 基因的序列片段,利用 Primer Premier 5.0 软件设计从头到趾引物(表 1),用以验证开放阅读框(ORF)序列的准确性。引物由捷瑞(上海)生物工程有限公司进行合成。

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

引物名称 primer name	引物序列 (5'-3') primer sequences (5'-3')	用途 application
GPI-F	TCTGTTTAGATAGTAGAAGAAGGT	ORF 验证
GPI-R	TGGAATCAGGTTTAGGGTT	ORF verification
PGK-F	GCCGCCTAAGGTAGCATCACG	
PGK-R	CTTTCGATAATACATCAGTTTCAAACATAGTG	
PK-F	TAATGGGTAGTGCCTGTTGT	
PK-R	ATCACCATCGGGATTAGC	
qGPI-F	GGGACATGGAAAGCAATGGCAAATC	定量
qGPI-R	CTAAGCGGGTTCCTTGGTGAAGAAG	PCR real time quantitative PCR
qPGK-F	GCGGCAAGATCACCAACAATCAAAG	
qPGK-R	CACAACAGACTTGGCTCCTTTCTCC	
qPK-F	CGTCAGACACCAACTCCAACAGATG	
qPK-R	GCAGCAGCATGACACTTGAATGAAG	
qPCR- $\beta$ -actin-F	TGATGGCCAAGTTATCACCA	内参基因
qPCR- $\beta$ -actin-R	TGGTCTCATGGATACCAGCA	internal control gene

以脑、后唾液腺 cDNA 为模板进行 3 个基因 ORF 的扩增。200  $\mu$ L EP 管中的反应体系为: dNTP Mix (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, 10 $\times$ EX Taq buffer (20 mmol/L) 5  $\mu$ L, EX Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, 上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ L, 无菌水补足至总体积为 50  $\mu$ L; 中华鲟 *GPI* 基因的 PCR 扩增参数如下: 94  $^{\circ}$ C, 5 min; 进行 35 个循环: 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s; 循环结束后, 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。中华鲟 *PGK* 基因的扩增反应体系同上, 退火温度设置为 56  $^{\circ}$ C。中华鲟 *PK* 基因的扩增反应体系同上, 退火温度设置为 56  $^{\circ}$ C。PCR 产物经纯化后送捷瑞(上海)生物工程有限公司测序。

#### 1.4 目的基因 cDNA 及其氨基酸序列分析

根据测序结果获得 *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 的 ORF, 利用 NCBI 的 BLAST 软件(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行同源性比对, 利用 EXPASY 网站的 Translate 软件(<http://web.expasy.org/translate/>)进行序列翻译。蛋白质结构域的分析通过 SMART 网站(<http://smart.embl.de/>)完成。编码的氨基酸序列多重比对使用 BioEdit 软件, 系统进化树采用 MEGA-X 软件的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建, bootstrap 值为 1000。

#### 1.5 中华鲟 *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 的表达分析

设计实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)引物用于 *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 基因的表达分析, 采用  $\beta$ -actin 作为内参基因, 引物序列见表 1。根据 biosharp<sup>®</sup> SYBR Green Master Mix 试剂盒(兰杰柯

科技, 广州)的操作说明进行 qRT-PCR, 反应体系: 模板 4.5  $\mu$ L, 上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.25  $\mu$ L, SYBR Green Realtime PCR Master Mix 5  $\mu$ L。反应程序采用三步法: 95  $^{\circ}$ C 变性 1 min; 进行 40 个循环: 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 15 s。循环结束后绘制溶解曲线, 以检验产物的特异性。以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算中华鲟不同组织/器官、不同的胚胎发育阶段、幼体不同饥饿时间以及投喂 3 种不同饲料时中华鲟消化腺的糖代谢相关基因的相对表达量, 并用 SPSS Statistics 23.0 统计软件对数据进行 *t* 检验和单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为显著水平。采用 GraphPad Prism.v8.0 软件做图, 数据以平均值 $\pm$ 标准误( $\bar{x} \pm SE$ )表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 中华鲟 *OsGPI*、*OsPGK*、*OsPK* 序列分析

本实验获得了 1725 bp 的中华鲟 *GPI* 基因的完整 ORF 区(GenBank 登录号: OP066308), 命名为 *OsGPI*, 编码 574 个氨基酸, 预测的蛋白质相对分子量 65.29093 kD, 等电点为 7.32。预测 *GPI* 蛋白质具有 PGI 结构域(59~566 aa)(图 1)。获得了 1248 bp 的中华鲟 *PGK* 基因的完整 ORF 区(GenBank 登录号: OP066309), 命名为 *OsPGK*, 编码 415 个氨基酸, 预测的蛋白质的相对分子量为 44.58517 kD, 等电点为 5.58。预测的 *PGK* 蛋白质具有 *PGK* 结构域(8~404 aa)(图 2)。获得了 1683 bp 的中华鲟 *PK* 基因的完整 ORF 区(GenBank 登录号: OP066310), 命名为 *OsPK*, 编码 560 个氨基酸, 预测的蛋白质

相对分子量 61.02241 kD, 等电点为 6.92。预测的 PK 蛋白质具有 PK 结构域(62~411 aa)和 PK\_C 结构域(426~544 aa)(图 3)。

### 2.2 中华蛸 *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 多重序列比对及系统进化树分析

氨基酸多重序列比对发现, *OsGPI* 蛋白与加州双斑蛸(*O. bimaculoides*)的 GPI 蛋白有最高的同源性, 一致性为 76.66%, 与紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)、

肩突硬蜱(*Ixodes scapularis*)、森林革蜱(*Derma-centor silvarum*)、欧洲大扇贝(*Pecten maximus*)、中国对虾(*Penaeus chinensis*)的 GPI 蛋白一致性为 56.1%~57.7%。GPI 系统进化树(图 4)显示: 软体动物门和节肢动物门聚为一大支同属于无脊椎动物, 其中中华蛸和加州双斑蛸与同为软体动物的紫贻贝、美洲牡蛎等聚为一支, 而后与节肢动物门的肩突硬蜱、森林革蜱、中国对虾聚为一大支, 而与另一大支脊椎动物分开。

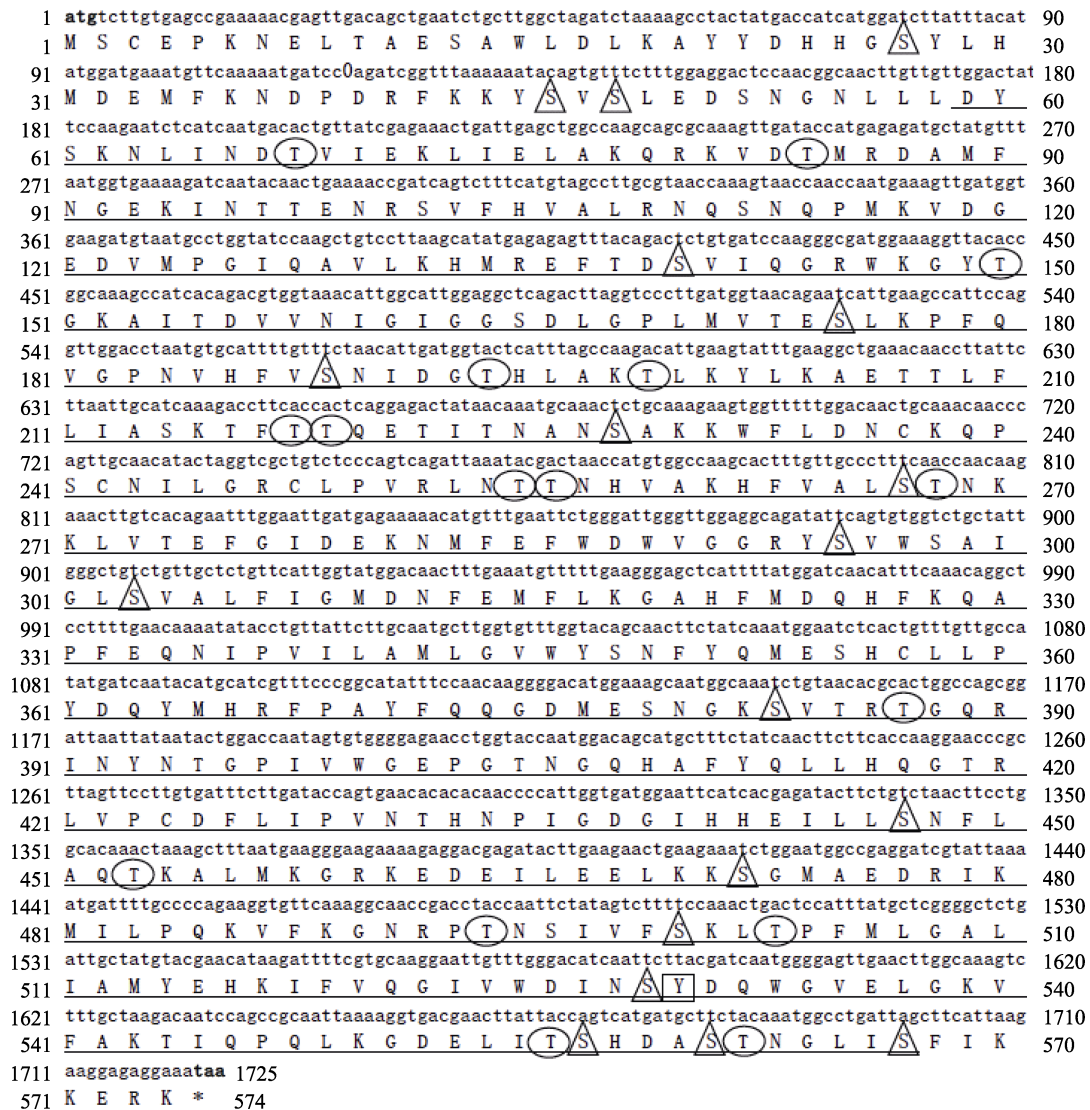


图 1 中华蛸 *OsGPI* 的开放阅读框序列及推导的氨基酸序列

起始密码子 atg 和终止密码子 taa 加粗表示; PGI 结构域以下划线表示; 丝氨酸磷酸化位点用三角形表示; 苏氨酸磷酸化位点用椭圆形表示; 酪氨酸磷酸化位点用矩形表示。

Fig. 1 Open reading frame and deduced amino acid sequences of *OsGPI* in *Octopus sinensis*. The initiation codon "atg" and the stop codon "taa" are shown by bold; PGI domain are shown by underline; serine phosphorylation sites are shown by triangles; threonine phosphorylation sites are shown by ovals; tyrosine phosphorylation sites are shown by rectangle.

```

1 atggctttcaacaactcggcattgacgatattgatgtcagtgaccaaaggggtctactcagagttgacttcaatgttccaaccaagggc 90
1 M A F N K L G I D D I D V S D Q R V L L R V D F N V P (T) K G 30
91 ggcaagatcaccaacaatcaagaattgttctgctctaccaactatccagatgctctggagaaggagccaagtctgttggccatg 180
31 G K I T N N Q R I V A A L P T I Q Y A L E K G A K (S) V V A M 60
181 agtcatttagggaggccagatggaaaacccaatgaaaatatcccttgaatgtgtagttcctgaacttgaaaacttttgggaaaatct 270
61 (S) H L G R P D G K P N E K (Y) (S) L K C V V P E L E K L L G K (S) 90
271 gttacatttcttctgaccgtgtgggtcccgaacggaagcctgtagtctgaaccaggttctgttttcttttggaaaacttg 360
91 V T F L (S) D R V G P E T E A A C (S) D P E P G S V F L L E N L 120
361 cgtttccacttagaagaagaagtaaaaggaactgatgatcatggtcaaaagatcaaagcaaaatcagatgatgtaagaggttccgtgag 450
121 R F H L E E E G K G (T) D D H G Q K I K A K (S) D D V K R F R E 150
451 tcattgtcgaactaggagatgtttatgtcaatgatgcctttgtgtacggctcaccgagcccacagctcaatggttgggttcaactccc 540
151 (S) L (S) K L G D V (Y) V N D A F G (T) A H R A H (S) S M V G V Q L P 180
541 cagaaagtggtggttttctcctcaaaaaggaactaacatattttgctaaggtccttgaagaccggaggaaccgttttttagccatcctt 630
181 Q K V A G F L L K K E L (T) (Y) F A K A L E R P E E P F L A I L 210
631 ggaggagccaaagtctgataagattaaactgattgagaatttctggagaagtaaatctgatgataatagggtggcatggctttc 720
211 G G A K V A D K I K L I E N L L E K V N L M I I G G M A F 240
721 acttttctcaagttattaacgacatggagattggggattccctctacgatgaagatgggtgccaaaattgtaaccgtctcatagaaaa 810
241 (T) F L K V I N D M E I G D (S) L (Y) D E D G A K I V N R L I E K 270
811 tcaagcagaacaatgtagaaatagtttgcctgttgattttgtaactgggtataaaatttctgaaaatgccacagttggtcaagctaca 900
271 (S) K Q N N V E I V L P V D F V (T) G D K F A E N A T V G Q A (T) 300
901 gtagaagaaggtattctcctgagacatattgggtttggatgttggagaagagacaacaagaattttctgaagttatgtctacagctaa 990
301 V E E G I P A G H M G L D V G E E (T) N K K F (S) E V I A T A K 330
991 actattgttggatggcctcctggcgtttttgaatttccgaagttctctaaaggtcctaatgtctatgatggatgctgtagtgaaagcc 1080
331 T I V W N G P P G V F E F P K F (S) K G (S) M (S) M M D A V V K A 360
1081 accgaagacgtgccacaactattgttggagggtgacactgctactgtgccaagttcaaaaccgagactaaagtggagccatgct 1170
361 T E D G A T (T) I V G G G D T A (T) C C A K F K T E (T) K V (S) H V 390
1171 agtacaggaggtggcgtactgtagaattgtcggaaaggagagtgcttccaggtgctgctgctttgaccactgcatag 1248
391 (S) T G G G A (S) L E L L E G R V L P G V A A L (T) T A * 415

```

图 2 中华蛸 *OsPGK* 的开放阅读框序列及推导的氨基酸序列

起始密码子 atg 和终止密码 tag 加粗表示; PGK 结构域以下划线表示; 丝氨酸磷酸化位点用三角形表示; 苏氨酸磷酸化位点用椭圆形表示; 酪氨酸磷酸化位点用矩形表示。

Fig. 2 Open reading frame and deduced amino acid sequences of *OsPGK* in *Octopus sinensis*

The initiation codon "atg" and the stop codon "tag" are shown by bold; PGK domain is shown by underline; threonine phosphorylation sites are shown by ovals; tyrosine phosphorylation sites are shown by rectangle.

氨基酸多重序列比对发现, *OsPGK* 蛋白与加州双斑蛸的 PGK 同源性最高, 为 94.50%, 与太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)、方头恐猛蚁(*Dinoponera quadriceps*)、印度跳蚁(*Harpegnathos saltator*)、凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)、日本对虾(*Penaeus japonicus*)的 PGK 蛋白一致性为 67.9%~75.6%。PGK 系统进化树(图 5)显示: 中华蛸和同为软体动物的加州双斑蛸等聚为一支, 再与节肢动物门的凡纳滨对虾、日本对虾等聚为一大支, 哺乳类和鱼类等脊椎动物聚为另一支。

氨基酸多重序列比对发现, *OsPK* 蛋白与加州双斑蛸的 PK 同源性最高, 一致性为 77.20%, 与虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、欧洲大扇贝、美洲牡蛎、太平洋牡蛎、凡纳滨对虾、中国对虾的 PK 蛋白一致性为 50.7%~56.0%。PK 系统进化

树(图 6)显示: 中华蛸与同为软体动物的加州双斑蛸、太平洋牡蛎、虾夷扇贝等聚为一支, 再与节肢动物门的凡纳滨对虾、中国对虾聚为一大支, 与另一大支脊椎动物分开。

### 2.3 中华蛸 *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 在不同组织/器官表达量

qRT-PCR 结果显示, 在成体不同组织/器官中, 3 个基因均有表达, *OsGPI* 主要表达部位在消化腺和脑。*OsPGK* 和 *OsPK* 在脑中表达量最高, 其次是后唾液腺和消化腺(图 7)。

### 2.4 中华蛸 *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 在胚胎不同发育时期表达量

在胚胎不同发育时期, *OsGPI* 在多细胞期、红珠期到黑珠期表达水平持续降低, 紧接着在初孵幼体时期表达水平显著升高; *OsPGK* 在多细胞期到红珠期和黑珠期表达水平开始升高, 最后在初

```

1 atggctcaactcttggcccaaccagggtgctgggaattgcagagaattcatctctccctttggattgcctggttctggtactcagaca 90
1 M A Q L L A Q P G A G E L Q R I H △ △ P F G L P G S C (T) (Q) (T) 30
91 aatgttggtcttcacacaacctcaggcagcttggccagatcacacaactggaacacatggttggattgattctgagcctgt 180
31 N V G L △ Q Q L Q A A C A R △ Q L E H M V A L D I D S E P C 60
181 catgtcgtatgagtggaattgtctgtactataggcccagcttgcacaagatgttgattctctaaagaagatgatgattgaaggaatgga 270
61 H V R M △ G I V C T I G P A C K D V D △ L K K M M I E G M D 90
271 gttgccagacttaattttctcatggatcatatgaataccatggtgaaactattaagaatgtgagagaagctaccagaagtgtgataaa 360
91 V A R L N F △ H G △ Y E Y H G E (T) I K N V R E A (T) Q K F D K 120
361 ccgaagataattgctgttgcaactggaatacaaaaggaccgagataagaacaggcctctcaagggtggtccctcagctgaagtgtctttg 450
121 P K I I A V A L D (T) K G P E I R T G L L K G G P △ A E V △ L 150
451 aaaacgggagcaaaaaataagattacaacaatgagagtgctatggaggcttgatgaaaatactttgatgttgattacaaaaacatt 540
151 (T) (G) A K I K I (T) T N E △ A M E A C D E N (T) L (Y) V D Y K N I 180
541 accaaagtcatgaaagtaggajctcgaatgtacattgatgatgcttaatttctgttattgttaaaaacatgggttctgactatattggat 630
181 (T) K V M K V G △ R M Y I D D G L I S V I V K N M G △ D (Y) M D 210
631 tgtgaaattgaaatgggtgaccttggtagtaagaagctgcaatttacctggagttctgttgattgctcctgacagaaaa 720
211 C E I E N G G D L G △ K K G C N L P G V P V D L P A V △ E K 240
721 gataaacaagatttcttctgctgtagaacaagcgttgatgtgtttgcttctttataagaagctgatggtgttcagaaaaac 810
241 D K Q D L L F G V E Q D V D M V F A △ F I R S A D G V R E I 270
811 agaaaaactctggagagaaaggaaaaagcattaaaattttgtgaaaattgaaaaccaccaaggcgtgaaaaactttgatgaaatttg 900
271 R K I L G E K K D I K I F V K I E N H Q G V K N F D E I L 300
901 aaggaaactgatggggtcattgttgcgctggtgatttgggtattgagattcctcctgaaaaagtgtttttgcccagaagatgatgata 990
301 K E T D G V M V A R G D L G I E I P P E K V F L A Q K M M I 330
991 gctaaatgcaacaagctggtaaacctgttatttggccactcagatgttggaaagtattggtgaagaaccacgtccaactcgagctgaa 1080
331 A K C N K A G K P V I C A T Q M L E △ M V K K P R P (T) R A E 360
1081 gctgggtgatgttgcaaatgctgttctggtgagtgagactgtgttatgttgcaggagaaactgcaaaaggctcctatccttggatgct 1170
361 A G D V A N A V L D G A D C V M L △ G E (T) A K G △ Y P L D A 390
1171 gttcgtatgatggctaaaattgctcgtgaagctgaatcgtgtgtttcattgcaactgtttgagaactcagagctcagacaccaact 1260
391 Y R M M A K I A R E A E △ A V F H △ Q L F E E L R R Q (T) (P) (T) 420
1261 ccaacagatgctaccacaccgttgaattgcaagctgtgaagctcattcaagtgtcatgctgctgctatcattgttattacaacaact 1350
421 P T D A T H T V A I A A V E A S F K C H A A A I I V I T T T 450
1351 ggaaggtcagctcatcttatttctgctctcgtccacgttgcacactcctggctgttactagaactgcacaggttgcctcagcgtcac 1440
451 G R S A H L I S A Y R P R C P I L A V T R T A Q V A R Q A H 480
1441 atgtatagaggattattccaatttattatgaagagaaaagacagctcaatggactgaggatgttgataaacgattcagagactcgt 1530
481 M Y R G I I P I Y Y E E K R D S Q W T E D V D K R I Q R A L 510
1531 gaagctggcagatgacattgttctcaaggagttcctctgattgtgactggttggaaactggttcaggcttcaactcaacag 1620
511 E A G H D H G F I F K G V P L V I V T G W K S G S G F T N T 540
1621 ctgagacttatcaatgcacccggcagagatgaaatgactcctattatggccagtcacttttga 1683
541 L R L I N A P G R D E M T P I M A S H F * 560

```

图 3 *OsPK* 的开放阅读框序列及推导的氨基酸序列

起始密码子 atg 和终止密码 tga 加粗表示; PK 结构域以下划线表示; PK\_C 结构域以阴影表示; 丝氨酸磷酸化位点用三角形表示; 苏氨酸磷酸化位点用椭圆形表示; 酪氨酸磷酸化位点用矩形表示。

Fig. 3 Open reading frame and amino acid sequences of *OsPK* in *Octopus sinensis*

The initiation codon “atg” and the stop codon “tga” are shown by bold; PK domain are shown by underline; PK\_C domain is shown by shade serine phosphorylation sites are shown by triangles; serine phosphorylation sites are shown by triangles; threonine phosphorylation sites are shown by ovals; tyrosine phosphorylation sites are shown by rectangle.

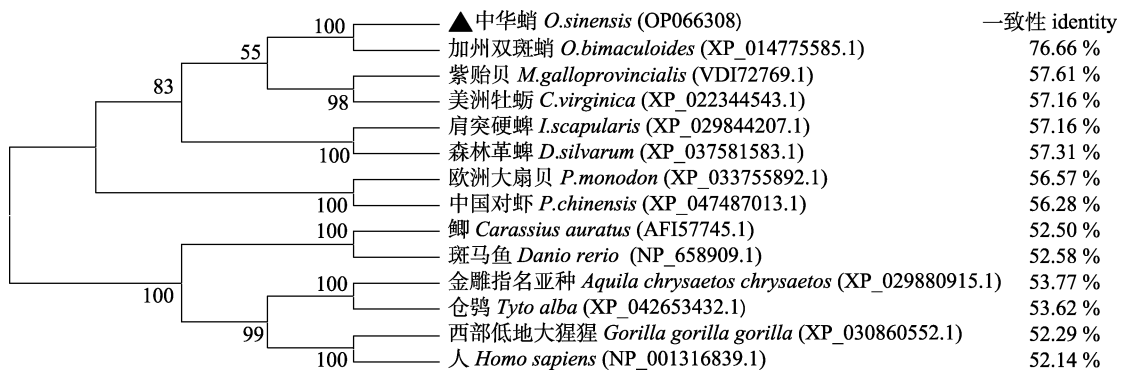


图 4 基于不同物种 GPI 序列构建的系统进化树

括号内为该物种的 GenBank 登录号, 百分数是中华蛸与其他物种同源性比对的一致性(%)。

Fig. 4 Phylogenetic tree based on GPI sequences from different species

The numbers in parentheses are the GenBank accession numbers of the species; the percentages are the identity (%) of multiple alignments between *Octopus sinensis* and other species.

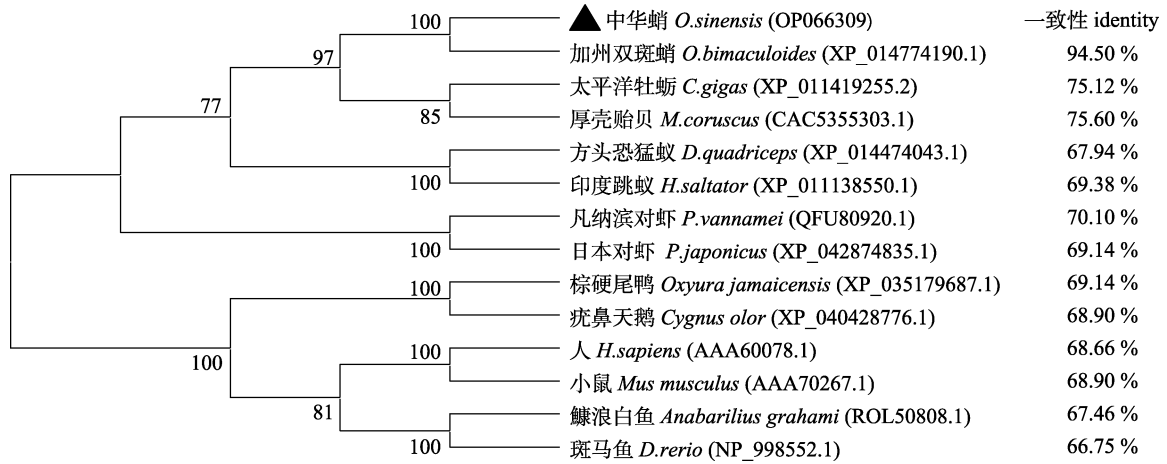


图 5 基于不同物种 PGK 序列构建的系统进化树  
括号内为该物种的 GenBank 登录号, 百分数是中华蛸与其他物种同源性比对的一致性(%)

Fig. 5 Phylogenetic tree based on PGK sequences from different species  
The numbers in parentheses are the GenBank accession numbers of the species; the percentages are the identity (%) of multiple alignments between *Octopus sinensis* and other species.

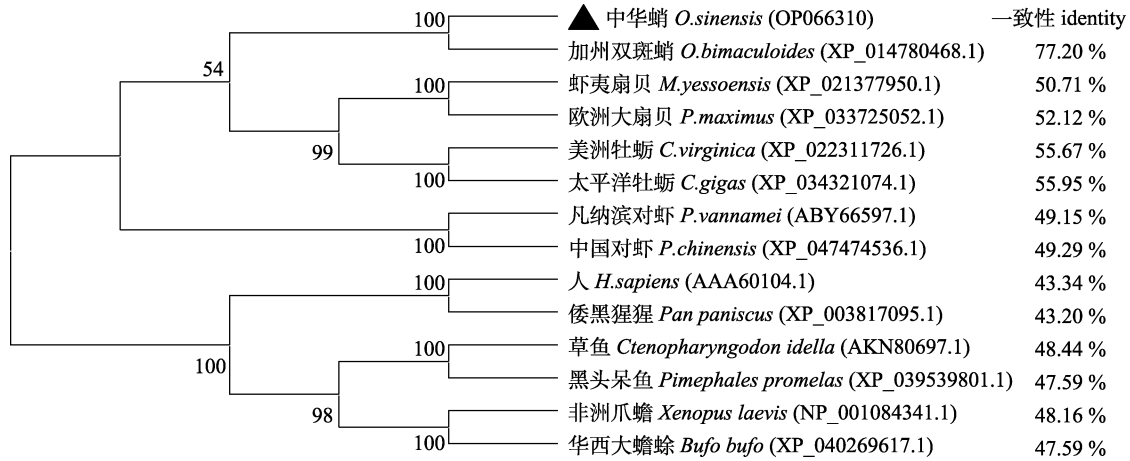


图 6 基于不同物种 PK 序列构建的系统进化树  
括号内为该物种的 GenBank 登录号, 百分数是中华蛸与其他物种同源性比对的一致性(%)

Fig. 6 Phylogenetic tree based on PK sequences from different species  
The numbers in parentheses are the GenBank accession numbers of the species; the percentages are the identity (%) of multiple alignments between *Octopus sinensis* and other species.

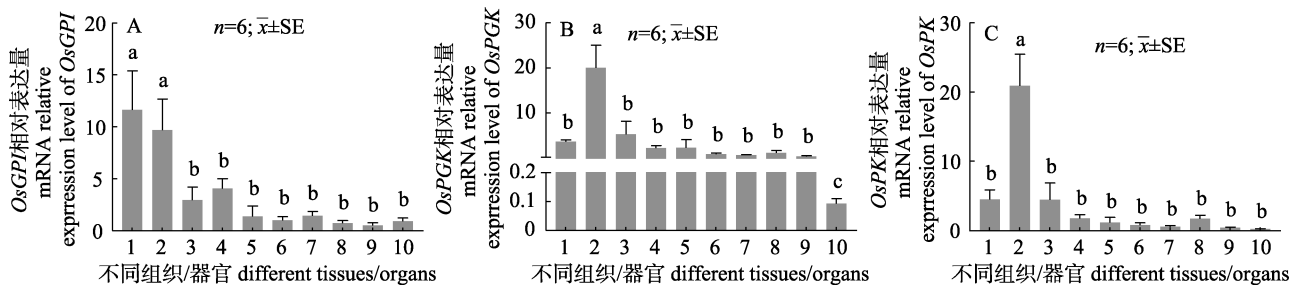


图 7 中华蛸 *OsGPI* (A)、*OsPGK* (B)和 *OsPK* (C)在不同组织/器官的表达情况

1: 消化腺; 2: 脑; 3: 后唾液腺; 4: 鳃心; 5: 鳃; 6: 心脏; 7: 小肠; 8: 眼; 9: 肾; 10: 肌肉.

不同的小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Fig. 7 The expression of *OsGPI* (A), *OsPGK* (B) and *OsPK* (C) in different tissues/organs of *Octopus sinensis*  
1: digestive gland; 2: brain; 3: posterior salivary glands; 4: branchial heart; 5: gill; 6: central heart; 7: intestines; 8: eye; 9: kidney; 10: muscle. The expression of significant differences is indicated by different lowercase letters ( $P < 0.05$ ).

孵幼体期具有最为显著的上调表达; *OsPK* 在各胚胎发育时期均无显著变化, 仅在红珠期与初孵幼体阶段具有上调趋势(图 8)。

## 2.5 中华蛸 *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 在不同的饥饿时间表达量

在幼体饥饿实验中, qRT-PCR 结果显示 *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 表达的趋势大体一致。与饥饿 0 d 相比, 三者的表达在饥饿 1 d 后均没有显著变化,

在饥饿 2 d 后显著降低; 在饥饿 3 d 后表达水平开始回升, *OsGPI* 和 *OsPK* 在饥饿 3 d 后的表达水平显著高于饥饿 0 d 和 1 d 的水平; 在饥饿 4 d 后, *OsGPI* 和 *OsPK* 表达水平开始回落, 而 *OsPGK* 具有最为显著的上调表达; 在饥饿 5 d 后, *OsGPI* 和 *OsPK* 表达水平持续下降, 显著低于饥饿 0 d 的水平, *OsPGK* 表达水平回落至饥饿 0 d 的水平(图 9)。

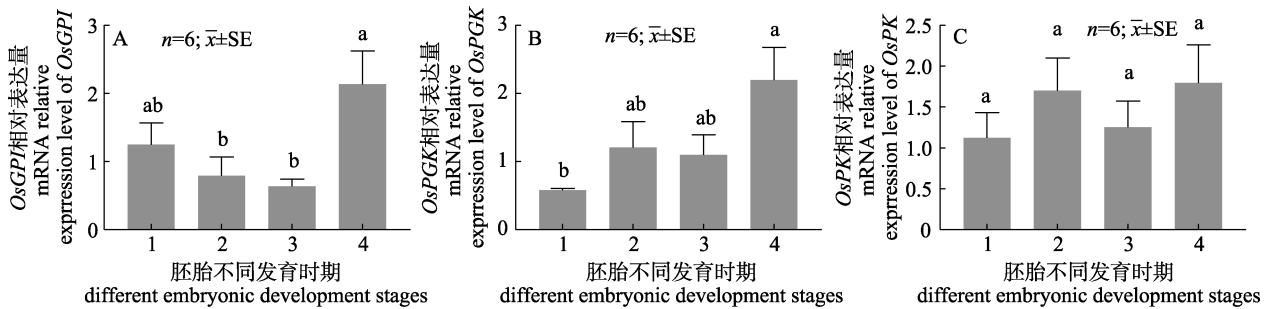


图 8 中华蛸 *OsGPI* (A)、*OsPGK* (B)和 *OsPK* (C)在胚胎不同发育时期的表达情况

1: 多细胞期; 2: 红珠期; 3: 黑珠期; 4: 初孵幼体。以不同的小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 8 The expression of *OsGPI* (A), *OsPGK* (B) and *OsPK* (C) in different embryonic development stages *Octopus sinensis*. 1: multicellular stage; 2: red-bead stage; 3: black-bead stage; 4: newly hatched larvae. Significant differences are indicated by different lowercase letters ( $P < 0.05$ ).

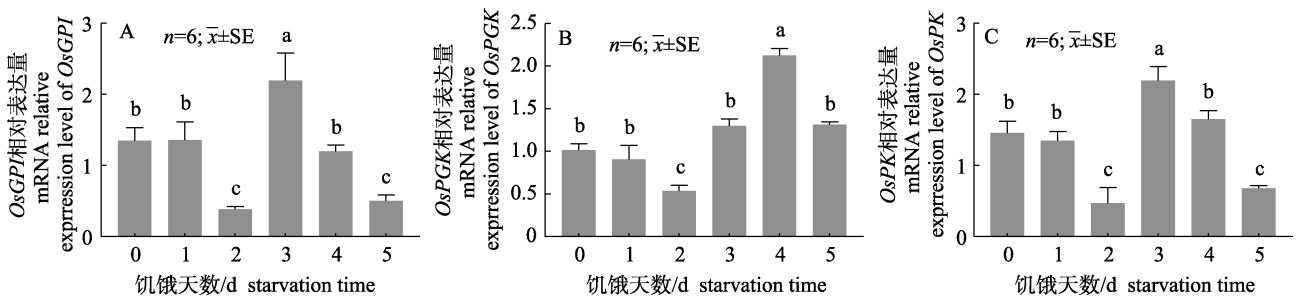


图 9 中华蛸 *OsGPI* (A)、*OsPGK* (B)和 *OsPK* (C)在幼体饥饿实验中的表达情况

以不同的小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 9 The expression of *OsGPI* (A), *OsPGK* (B) and *OsPK* (C) in the larval *Octopus sinensis* starvation experiment. Significant differences are indicated by different lowercase letters ( $P < 0.05$ ).

## 2.6 投喂三种饲料对中华蛸 *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 表达量的影响

用 3 种饲料投喂中华蛸, 结果显示配合饲料组和沙丁鱼组在投喂 21 d 后, *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 在中华蛸消化腺的表达与投喂 0 d 相比均有不同程度的升高, 在投喂 42 d 后, *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 的表达量出现不同程度的回落。锐齿螳组在投喂 21 d 和 42 d 后, *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 的表达量相较投喂 0 d 时的均显著升高(图 10)。

## 3 讨论

头足类动物的能量代谢中碳水化合物是必不可少的<sup>[19]</sup>。本研究克隆获得了中华蛸糖代谢酶相关的 *GPI*、*PGK* 和 *PK* 基因, 系统进化树分析结果显示, 中华蛸的 *GPI*、*PGK* 和 *PK* 蛋白都与加州双斑蛸聚为一支, 一致性最高, 说明 3 个基因在头足纲中具有保守性。

中华蛸 *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 基因在消化



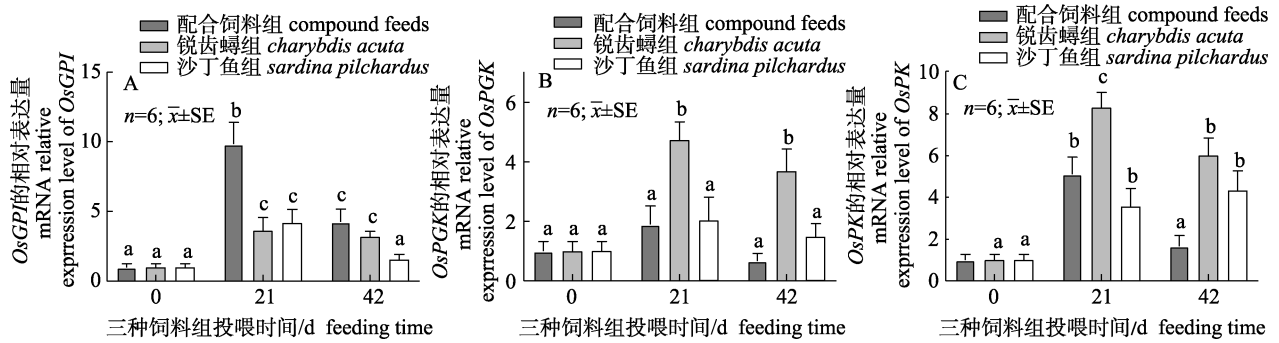


图 10 中华蛸 *OsGPI* (A)、*OsPGK* (B) 和 *OsPK* (C) 在 3 种不同饲料投喂下的表达情况

以不同的小写字母表示任意两组之间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 10 The expression of *OsGPI* (A), *OsPGK* (B) and *OsPK* (C) of *Octopus sinensis* fed with three diets. Different lowercase letters indicate significant differences between any two groups ( $P < 0.05$ ).

腺、脑、后唾液腺和鳃心等组织/器官中均有表达,但在不同组织/器官间的表达水平具有显著差异,其中 *OsGPI* 在消化腺和脑中表达量远高于其他组织/器官; *OsPGK* 和 *OsPK* 在脑中表达量最高,后唾液腺和消化腺次之。消化腺和后唾液腺是中华蛸吸收、转化和代谢营养物质的主要场所,消化腺在消化吸收过程中催化果糖-6-磷酸转化为葡萄糖-6-磷酸,保证机体的血糖水平处于正常水平,也需要满足脑组织对葡萄糖持续消耗的需要<sup>[20]</sup>,因此这 3 个基因在各组织的表达特征可能与不同组织行使的生物功能密切相关。Mo 等<sup>[21]</sup>研究发现斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 肝脏中分离得到的 GPI 异构酶活性要高于肌肉组织的 GPI,徐晶等<sup>[22]</sup>研究发现糖代谢相关 6-磷酸葡萄糖酶催化亚基的 *g6pca* 和 *g6pcb1* 基因主要在草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 糖异生作用的组织中表达,在脑和肝脏中表达较高,与本研究 *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 3 个基因的表达特性一致。

中华蛸胚胎发育主要包括多细胞期、红珠期、黑珠期和初孵幼体<sup>[23]</sup>, *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 基因在中华蛸胚胎发育这 4 个时期均可检测到,总体趋势是初孵幼体的表达量高于多细胞期。初孵幼体时,幼蛸的体态形成,机体的各项器官与组织皆已发育完成, *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 的表达量在该期有所上升是其消化代谢能力提高的体现。

中华蛸产卵量大、食物转化率高、生长速度快<sup>[24]</sup>,其全人工养殖具有巨大的发展潜力和广阔的前景,然而其幼体阶段的高死亡率限制其大规模

养殖<sup>[25]</sup>。而在此阶段,饵料不适导致饥饿是引起仔蛸死亡的主要原因之一<sup>[26]</sup>。动物在饥饿状态下一般通过消耗其自身的储备能量物质以满足正常生命活动的能量需求<sup>[27]</sup>,中华蛸在饥饿初期,储存的碳水化合物迅速耗尽后,更多地依赖脂质和氨基酸作为能量代谢来源,相同的代谢研究结果在其他头足类动物中均有报道<sup>[28]</sup>,本实验 *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 3 个基因在饥饿应激从 1 d 到 2 d 时表达量显著降低也证实了这一结论。在饥饿应激 3 d 和 4 d 时,参与糖异生/糖酵解的 3 个基因表达量显著升高,提示中华蛸幼体在饥饿条件下确实存在能量转换过程。饥饿 5 d 时,3 个基因的表达开始下降,说明机体可供利用的脂质和蛋白质基本耗尽,此时幼体绝大多数死亡。本研究表明头足类动物参与糖异生/糖酵解的相关基因对饥饿的响应随饥饿时间的变化而变化,应进一步深入了解中华蛸幼体饥饿应激下的代谢调节机制,寻找合适的开口饲料以克服营养不足造成的高死亡率。

在蛸类养殖中,通常用杂蟹、杂鱼等作为饲料进行投喂,此外,用人工饲料部分或全部代替天然饵料势在必行。因此本实验选择配合饲料、锐齿螭和沙丁鱼 3 种饲料进行投喂。配合饲料组和沙丁鱼组在投喂 21 d 后, *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 在中华蛸消化腺的表达与投喂 0 d 的相比均有不同程度的升高,在投喂 42 d 后,观察到配合饲料组和沙丁鱼组的中华蛸摄食量明显减少,推测一方面由于中华蛸是肉食性动物,配合饲料不

适口, 另一方面有相关研究表明由于鱼类的饱和脂肪酸含量较高, 长期摄食鱼类之后出现拒食现象<sup>[29]</sup>, 此外 *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 的表达量呈现不同程度的回落, 这表明随着投喂时间的增加, 摄食量减少, 配合饲料组和沙丁鱼组的中华蛸已不能从食物中获得足够的能量, 机体通过对消化腺糖代谢能力的调整来保存可用的葡萄糖。锐齿螭组在投喂 21 d 和 42 d 后, *OsGPI*、*OsPGK* 和 *OsPK* 的表达量相较投喂 0 d 时的均显著升高, 一定程度表明此时体内具有旺盛的糖代谢及其他能源物质向糖类转换过程, 说明锐齿螭具有良好的营养特性, 可以满足中华蛸的能量需求。骆启豪<sup>[18]</sup>用蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)、天津厚蟹(*Helice tridens tientsinensis*)、四角蛤蜊(*Macra veneriformis*)和日本枪乌贼(*Loligo japonica*)分别投喂真蛸, 比较对真蛸生长性能指标和肠道菌群的影响, 认为蟹类是真蛸理想的饵料。

糖代谢作为中华蛸能量物质的重要途径<sup>[3-4,30]</sup>, 其关键酶的相关基因 *OsGPI*、*OsPGK* 与 *OsPK* 在幼体发育过程和幼体饥饿中发挥重要的作用; 锐齿螭是实验中最适合中华蛸生长的天然饵料, 投喂锐齿螭后 *OsGPI*、*OsPGK* 与 *OsPK* 的表达谱与投喂人工饲料相比存在明显的不同, 这一表达模式可为中华蛸人工饲料的研发提供重要的参照。

#### 参考文献:

- [1] Rojas-Pirela M, Andrade-Alviarez D, Rojas V, et al. Phosphoglycerate kinase: Structural aspects and functions, with special emphasis on the enzyme from Kinetoplastea[J]. Open Biology, 2020, 10(11): 200302.
- [2] Miyamoto T, Amrein H. Gluconeogenesis: An ancient biochemical pathway with a new twist[J]. Fly, 2017, 11(3): 218-223.
- [3] Jitrapakdee S. Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2012, 44(1): 33-45.
- [4] Akagi S, Ohmori S. Threonine is the best substrate for D-lactate formation in octopus tentacle[J]. Amino Acids, 2004, 26(2): 169-174.
- [5] Ruan M M. Gene cloning and expression analysis of glucose-6-phosphate isomerase from silver carp[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012. [阮密密. 鲢鱼葡萄糖-6-磷酸异构酶的基因克隆及表达分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.]
- [6] Han J Z, Dong W M, Ge C R, et al. Effect of Chinese herb feed additives on the activities of CPK and GPI and meat qualities of growing and finishing pigs[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2002, 17(1): 91-93. [韩剑众, 董文明, 葛长荣, 等. 中草药添加剂饲喂猪肉中 CPK, GPI 活性和肉质关系的研究[J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(1): 91-93.]
- [7] Wu D, Wu Z D, Yu X B. Advance in the research of phosphoglycerate kinase[J]. China Tropical Medicine, 2005, 5(2): 385-387, 276. [吴德, 吴忠道, 余新炳. 磷酸甘油酸激酶的研究进展[J]. 中国热带医学, 2005, 5(2): 385-387, 276.]
- [8] Yin W L, Cui D Y, Li Y Y, et al. Cloning and response of pyruvate kinase(PK) gene to seawater acidification in sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2020, 35(3): 360-367, 9. [尹文露, 崔东遥, 李莹莹, 等. 中间球海胆丙酮酸激酶(PK)基因克隆及其对海水酸化的响应[J]. 大连海洋大学学报, 2020, 35(3): 360-367, 9.]
- [9] Gleadall I G. *Octopus sinensis* Orbigny, 1841 (Cephalopoda: Octopodidae): Valid species Name for the commercially valuable east Asian common Octopus[J]. Species Diversity, 2016, 21(1): 31-42.
- [10] Li F H, Liu Y Y, Qin B, et al. Sequence and phylogenetic analysis of the mitochondrial genome for the East Asian common Octopus, *Octopus sinensis* (Octopodidae: Octopoda)[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2021, 6(8): 2120-2122.
- [11] Ma Z M, Xu S H, Jia X P. Research status and exploitation prospect in production, basic biology and aquaculture of octopus[J]. South China Fisheries Science, 2008, 4(5): 69-73. [马之明, 徐实怀, 贾晓平. 蛸类渔业概况及增养殖研究现状与展望[J]. 南方水产, 2008, 4(5): 69-73.]
- [12] Zhou M, Quan C, Wu Z H, et al. Research progress of nutritional physiology and feed development for cephalopods[J]. Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2019, 32(4): 62-71. [周萌, 全成, 吴灶和, 等. 头足类营养生理与饲料开发研究进展[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2019, 32(4): 62-71.]
- [13] Lamarre S G, MacCormack T J, Sykes A V, et al. Metabolic rate and rates of protein turnover in food-deprived cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus 1758)[J]. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2016, 310(11): R1160-R1168.
- [14] Speers-Roesch B, Callaghan N I, MacCormack T J, et al. Enzymatic capacities of metabolic fuel use in cuttlefish (*Sepia officinalis*) and responses to food deprivation: Insight

- into the metabolic organization and starvation survival strategy of cephalopods[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2016, 186(6): 711-725.
- [15] Akagi S, Ohmori S. Threonine is the best substrate for D-lactate formation in *Octopus tentacle*[J]. *Amino Acids*, 2004, 26(2): 169-174.
- [16] Sun Y L, Yao C J, Zhu Y F, et al. Metabolism response of fasting in *Octopus sinensis* paralarvae revealed by RNA-seq[J]. *Aquaculture*, 2022, 550: 737859.
- [17] Ma H N, Zhou P P, Lu Y, et al. Effects of different lipid and glucose levels on growth performance, hepatic glycolysis and gluconeogenic key enzyme activities of large yellow croaker (*Larimichthys crocea* Richardson)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(10): 3110-3122. [马红娜, 周飘苹, 陆游, 等. 不同脂肪和葡萄糖水平对大黄鱼生长性能、肝脏糖酵解和糖异生关键酶活性的影响[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(10): 3110-3122.]
- [18] Luo Q H. Effects of four diets on the growth, intestinal microorganisms, flavor and nutritional ingredients of *Octopus vulgaris*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021. [骆启豪. 四种饵料对真蛸(*Octopus vulgaris*)生长、肠道微生物和风味营养的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2021.]
- [19] Hochachka P W. Oxygen efficient design of cephalopod muscle metabolism[J]. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 1995, 25(1-3): 61-67.
- [20] Dando P R. Distribution of multiple glucosephosphate isomerases in teleostean fishes[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Comparative Biochemistry*, 1974, 47(3): 663-679.
- [21] Mo Y, Young C D, Gracy R W. Isolation and characterization of tissue-specific isozymes of glucosephosphate isomerase from catfish and conger[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250(17): 6747-6755.
- [22] Xu J, Liang X F, Cai W J, et al. Gene expression analysis of three 6-phosphoglucose catalytic subunits in grass carp and the effects of a high carbohydrate diet on gene expression[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(1): 24-36. [徐晶, 梁旭方, 蔡文静, 等. 草鱼 3 个 6-磷酸葡萄糖酶催化亚基的基因表达分析及高糖饲料对其表达的影响[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(1): 24-36.]
- [23] Xu S H, Ma Z M, Jia X P. Biological characteristics and embryonic development of *Octopus vulgaris* under artificial farming condition[J]. *South China Fisheries Science*, 2009, 5(2): 63-68. [徐实怀, 马之明, 贾晓平. 人工养殖条件下真蛸的生物学特性及胚胎发育[J]. *南方水产*, 2009, 5(2): 63-68.]
- [24] Iglesias J, Sánchez F J, Bersano J G F, et al. Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: Present status, bottlenecks and trends[J]. *Aquaculture*, 2007, 266(1-4): 1-15.
- [25] Villanueva R, Sykes A V, Vidal E A G, et al. Current status and future challenges in cephalopod culture[M]//*Cephalopod Culture*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014: 479-489.
- [26] Xu D F. Studies on larvae development of *Octopus vulgaris* and the effects of environmental stress on larvae[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019. [徐大风. 真蛸幼体生长发育及环境胁迫对幼体的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.]
- [27] Li R X, Liu H Y, Tan B P, et al. Effects of starvation and refeeding on growth performance, glucose metabolism, and expression of glucose transporter 1 in *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(1): 74-85. [李锐鑫, 刘泓宇, 谭北平, 等. 饥饿及再投喂处理对草鱼生长、葡萄糖代谢和转运蛋白 1 表达的影响[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(1): 74-85.]
- [28] O'Dor R K, Mangold K, Boucher-Rodoni R, et al. Nutrient absorption, storage and remobilization in *Octopus vulgaris*[J]. *Marine Behaviour and Physiology*, 1984, 11(3): 239-258.
- [29] Zhang J M. Effects of two diets of fish and crab on the amino acid and fatty acid composition of the digestive gland of *Octopus vulgaris*[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2020, 42(2): 132-137. [张建明. 两种饲料对真蛸消化腺氨基酸和脂肪酸组成的影响[J]. *渔业研究*, 2020, 42(2): 132-137.]
- [30] Hochachka P W. Oxygen efficient design of cephalopod muscle metabolism[J]. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 1995, 25(1-3): 61-67.

## Cloning and expression analysis of genes related to glucose metabolism in *Octopus sinensis*

CHEN Xiaoling<sup>1</sup>, SUN Yulong<sup>2</sup>, ZHU Youfang<sup>3</sup>, ZHANG Ziping<sup>2</sup>, WANG Yilei<sup>1</sup>

1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. College of Marine Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

3. Putian Municipal Institute of Fishery Science, Putian 351100, China

**Abstract:** At present, the cultivation of cephalopods mainly relies on natural feeds. The absence of artificial compound feeds is a restrictive factor for the large-scale development of the cultivation of cephalopods. The genes related to glucose metabolism in *Octopus sinensis*, including glucose phosphate isomerase (*GPI*), phosphoglycerate kinase (*PGK*), and pyruvate kinase (*PK*), were cloned, and their expression levels were examined to study the glucose metabolism pattern of *O. sinensis* and provide a reference for optimizing the proportion of carbohydrates in its compound feed. The results showed that the open reading frame (ORF) length of *OsGPI* was 1725 bp encoding 574 amino acids, the ORF length of *OsPGK* was 1248 bp encoding 415 amino acids, and the ORF length of *OsPK* was 1683 bp encoding 560 amino acids. The sequence alignment and phylogenetic tree results showed that the identity of *O. sinensis* GPI, PGK, and PK proteins was the closest to that of *Octopus bimaculoides*. qRT-PCR results showed that these three genes were expressed in different tissues/organs of *O. sinensis*, with *OsGPI* having the highest expression level in the digestive gland and brain, and *OsPGK* and *OsPK* in the brain, followed by posterior salivary glands and the digestive glands. This difference in expression distribution may be related to the biological functions performed by different tissues/organs. *OsGPI*, *OsPGK* and *OsPK* were expressed in different developmental stages, with the highest expression at the hatchling stage. During starvation stress in larvae, the expression levels of *OsGPI*, *OsPGK*, and *OsPK* decreased significantly after 2 days (d) of starvation, followed by a significant increase in expression levels after 3 d or 4 d of starvation. Finally, the expression levels started to decrease after 5 d of starvation. In the experiment of feeding compound feeds, *Charybdis acuta* or *Sardina pilchardus*, the expression levels of *OsGPI*, *OsPGK*, and *OsPK* in the digestive gland of *O. sinensis* were increased to varying degrees in the compound feed group and *S. pilchardus* group after 21 d feeding. The expression levels of *OsPGK* and *OsPK* decreased to varying degrees. The expression levels of *OsGPI*, *OsPGK*, and *OsPK* were significantly increased in the *C. chinensis* group after feeding for 21 d and 42 d, compared to those at 0 d. After 42 d of feeding, the expression levels of *OsGPI*, *OsPGK*, and *OsPK* decreased to varying degrees. The expression levels of *OsGPI*, *OsPGK*, and *OsPK* were significantly increased in the *C. acuta* group after feeding for 21 d and 42 d, compared to those at 0 d. The expression patterns of *OsGPI*, *OsPGK*, and *OsPK* during different embryonic development stages, starvation, and feeding of different feeds indicated that they were involved in regulating glucose metabolism in *O. sinensis*. These results may aid in the selection of diets and the addition of carbohydrates in compound feeds.

**Key words:** *Octopus sinensis*; glucose metabolism; starvation; feed; expression analysis

**Corresponding author:** WANG Yilei. E-mail: ylwang@jmu.edu.cn.