

DOI: 10.12264/JFSC2023-0032

## 大口黑鲈糖稳态基因的克隆、分子特征及其营养调控的分析

雷彩霞<sup>1</sup>, 宋含茹<sup>2</sup>, 付豪<sup>1</sup>, 谢玉净<sup>1</sup>, 李胜杰<sup>1</sup>

1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;

2. 湖州师范学院生命科学学院, 浙江 湖州 313000

**摘要:** 为进一步研究大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)糖稳态调控特性, 本研究克隆了糖稳态调控基因 *gp1*、*gp2*、*pepck1*、*pepck2*、*hk*、*pfk* 和 *g6p*, 分别编码 878、842、635、624、918、780 和 338 个氨基酸序列, 并进行了进化树、空间分布和禁食对其基因表达影响的分析。多序列比对和进化树分析显示, 这些基因与其他脊椎动物的同源序列具有较高相似性。组织表达分析结果显示这些基因主要集中分布于肝脏和肌肉, 但呈现出组织表达差异性。其中, *gp1* 在肌肉表达量最高, 肝脏次之, 在脾脏表达量最低。*gp2* 在肌肉中的 mRNA 水平也最高, 在心脏、肝脏表达也较为丰富。*pepck1* 主要分布在肝脏和肠, 在脑、脾脏、肾脏和脂肪中分布较少。*pepck2* 在肝脏和脑中高表达, 而在脾脏和鳃中表达量最低。对于 *hk*, 其在肝脏、肌肉和心脏的 mRNA 水平显著高于其余组织。肝脏中 *g6p* 的表达也显著高于其余组织。除此之外, 其在肌肉、肠和脂肪中分布也较为丰富。*pfk* 的 mRNA 水平在肝脏和心脏最高, 其次是肠和鳃。对实验大口黑鲈禁食后发现, 肝脏 *gp2*、*pepck2* 和 *g6p* 的表达从禁食第 6 小时开始上调并持续到 24 h。而 *gp1*、*hk* 和 *pfk* 的表达则随禁食延长先上升后下降, 并在第 6 小时达到峰值。然而, 肝脏 *pepck1* 基因在整个禁食阶段均趋于稳定。肌肉组织中, *gp1* 的转录随禁食延长而持续增强, 至 24 h 达到最高值。*gp2* 和 *g6p* 表达均在禁食第 12 小时出现明显升高, 并在 24 h 达到峰值。*pepck1* 在禁食第 0 小时的 mRNA 水平最低, 在 12 和 24 h 时最高。禁食第 24 小时 *pepck2* 的表达显著最高。*hk* 和 *pfk* 则随禁食延长呈现先升后降的模式, 其最高和最低值分别出现在禁食第 6 和第 0 小时。综上, 本研究获得了糖稳态调控关键基因的完整编码序列, 并研究了其在应对饥饿状态时的不同分子应答, 研究结果将为后期进一步研究大口黑鲈糖稳态调控提供重要基础资料。

**关键词:** 大口黑鲈; 糖稳态基因; 克隆; 表达分析; 营养调控

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)05-0604-13

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)又名加州鲈, 隶属于鲈形目(Perciformes), 太阳鱼科(Ceetrachidae), 黑鲈属, 原产于北美, 20 世纪 70 年代从台湾地区引入大陆后于 1983 年繁殖成功, 并开始人工养殖。据统计, 2021 年我国大口黑鲈年产量已超过 70 万 t<sup>[1]</sup>, 大口黑鲈产业在渔业转型升级和乡村振兴过程中发挥着重要作用。目前, 膨化配合饲料已基本取代冰鲜饵料在大口黑鲈人工养殖过程中

得到普及。糖类物质是鱼类配合饲料中的重要组成部分, 一方面“糖”是最为经济的非含氮供能物质, 能够节约成本和减少对养殖水体的污染, 另一方面则有助于颗粒饲料的膨化<sup>[2]</sup>。然而, 源于在野外条件下面临的高蛋白低糖的摄食环境, 鱼类(尤其是肉食性鱼类)在漫长的进化过程中适应性形成了“糖不耐受”的体质<sup>[3]</sup>。作为一种肉食性鱼类, 大口黑鲈对于糖的利用能力可能较虹鳟

收稿日期: 2023-02-20; 修订日期: 2023-03-31.

基金项目: 2022 年省级乡村振兴战略专项资金种业振兴项目资金(2022-SPY-00-003); 广东省基础与应用基础研究基金项目(2023A1515010215); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2022SJ-XK4); 广州市科技计划项目(2023A04J0092).

作者简介: 雷彩霞(1990-), 女, 助理研究员, 研究方向为水生动物种质资源及遗传育种. E-mail: leicaixia0703@sina.com

通信作者: 李胜杰, 男, 研究员, 研究方向为水生动物种质资源及遗传育种. E-mail: ssjjli@163.com

(*Oncorhynchus mykiss*)、南方鲇(*Silurus meridionalis*)和大西洋鲑(*Salmo salar*)等其他肉食性鱼类更差<sup>[4]</sup>。Amoah 等<sup>[5]</sup>发现饲料糖添加水平在 13%时,大口黑鲈增重率最高。随后有学者指出,大口黑鲈饲料中可消化淀粉水平应控制在 10%以内<sup>[6]</sup>。摄食过多的糖类会导致大口黑鲈出现生长缓慢、死亡率上升、肝脏组织空泡化、引发炎症反应等现象<sup>[7-8]</sup>。因此,研究养殖鱼类,尤其是肉食性鱼类的糖代谢问题一直以来都是学术界的热点之一。

葡萄糖是饲料中的糖类物质在机体内消化后的主要产物<sup>[3]</sup>。经消化吸收的葡萄糖,约 1%可直接通过尿和鳃排出体外<sup>[9]</sup>,大多数则由血液运输到各个部位进行多种合成与分解代谢,如糖酵解、糖异生、糖原合成与分解等<sup>[10]</sup>,众多酶类共同参与从而维持血糖维持在一个特定的范围,即血糖的稳态平衡。己糖激酶(hexokinase, HK)和磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)是糖酵解途径的限速酶,分别起始该代谢途径的两个磷酸化反应步骤,而糖酵解也是所有生物(包括鱼类)分解葡萄糖的唯一途径<sup>[11]</sup>。哺乳动物研究表明,刺激糖酵解是机体在高糖胁迫下维持糖稳态的有效方式之一<sup>[12]</sup>。对鱼类的一些研究也发现 HK 酶活性和 *pfk* 的基因表达随着饲料糖水平的上升而增强<sup>[13-14]</sup>。然而, Su 等<sup>[15-16]</sup>对长吻鲈(*Leiocassis longirostris* Günther)的研究结果显示,糖酵解途径并不受饲料糖水平的调控。在南方鲇中也有类似的发现<sup>[17]</sup>,说明饲料糖对糖酵解的调控可能存在种属差异。糖异生是机体利用甘油、乳酸、氨基酸等为底物合成葡萄糖的过程。鱼类拥有高效的葡萄糖内源合成能力,在高糖饲喂条件下,磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)和葡萄糖-6-磷酸酶(Glucose-6-phosphatase, G6P)等糖异生途径关键酶<sup>[18]</sup>基因的转录仍然活跃<sup>[19-21]</sup>。因此,糖异生不受控一直以来被认为是鱼类无法有效地维持血糖稳态的重要原因之一。糖原是葡萄糖在机体内储存的主要形式,与高等脊椎动物一样,鱼类可以将多余的葡萄糖以糖原的形式储存于肝脏和肌肉中<sup>[22]</sup>。大量研究报道指出,

肝糖原的代谢(合成和分解)与血糖水平具有正相关性<sup>[23-24]</sup>。与肝糖原不同,肌糖原的分解主要取决于肌肉组织对 ATP 的需求(如快速游动等),而不受禁食等低血糖状态的影响<sup>[22,25]</sup>。虽然肌肉组织对于糖原的储存能力(0.4~2 mg/g)远低于肝脏组织(200 mg/g),但由于肌肉组织在体重中占有很大比例(>50%),肌糖原的总体含量可能高于肝糖原<sup>[26]</sup>。因此,肌糖原动员的“封闭性”也不利用鱼类对糖的利用。此外,在禁食等状态下动用糖原分解供能也具有种属特异性。在欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)、金头鲷(*Sparus aurata*)、褐鳟(*Salmo trutta*)等的研究指出,禁食初期,其肝糖原就开始大量分解以维持血糖稳态平衡;相比之下,鲤(*Cyprinus carpio*)、美洲鳗(*Anguilla rostrata*)、大西洋鲑等更加偏向于分解脂肪供能<sup>[27]</sup>。作为糖原分解的限速酶,目前对于糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase, GP)的研究还相对较少。

综上所述,养殖鱼类对饲料糖的利用既具有复杂性又具有种属差异性。为此,本研究以我国重要的肉食性经济养殖鱼类大口黑鲈为对象,采用 RT-PCR 技术克隆了参与大口黑鲈糖稳态调节途径关键基因 *hk*、*pfk*、*pepck1*、*pepck2*、*g6p*、*gp1* 和 *gp2* 的全长序列,研究了其在不同组织中的表达丰度,并探讨了这些基因在禁食条件下的分子应答。本研究结果可丰富 cDNA 基因文库,为进一步深入研究大口黑鲈葡萄糖稳态调控提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼准备及样品收集

本实验基因克隆用鱼(6 尾)购买于当地一个商业市场,体重约为 500 g(性别随机)。实验正式开始前,先将实验鱼在自然条件下暂养于 500 L 塑料桶中,并提供>5.0 mg/L 氧气。约 6 h 后,使用 0.01%的 2-苯氧基乙醇(Sigma-Aldrich)对实验鱼进行麻醉,随后快速剖取肝脏、肌肉、脑、脾脏、肾脏、前肠、中肠、后肠、鳃、脂肪(腹腔肠系膜)和心脏组织,用预冷的磷酸盐缓冲液(pH=7.4,碧云天生物科技有限公司)漂洗 2 遍,于

液氮中快速冷冻,最后转移至 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。为研究目标基因对禁食的应答,将 240 尾体重为 $(49.08\pm 4.39)$  g 的实验鱼(由广东梁氏水产种业有限公司提供,佛山,广东)随机分为 4 组,每组 3 个重复,每个重复 20 尾鱼,饲养于 500 L 的塑料桶中(自然光照,溶解氧 $>5.0$  mg/L),每天在 8:30, 12:30, 16:30 用商业饲料(福建天马饲料有限公司)进行饱食投喂。最后一餐后,先对实验鱼禁食 12 h (定为禁食第 0 h)再继续进行禁食,并分别在禁食第 0、6、12、24 小时按照上述方法收集实验鱼的肝脏和肌肉组织(每个桶随机采集 4 尾鱼),于液氮中快速冷冻,再转移至 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

## 1.2 基因克隆

根据本研究室前期大口黑鲈的转录组数据库<sup>[28]</sup>,通过 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的 BLAST 程序,经与其他物种上的同源基因进行比对以及使用 DNAsar 软件的 SeqMan 程序进行序列拼接,最终确定目标基因序列。使用 Primer 5.0 设计特异性引物,进行基因扩增(表 1)。

使用商业的 RNAiso Plus (TaKaRa, Dalian, China)试剂,根据说明书推荐步骤从肝脏、肌肉、脑、脾脏、肾脏、前肠、中肠、后肠、鳃、脂肪和心脏组织中提取总 RNA。将提取的 RNA 进行 1%的琼脂糖凝胶电泳以确定其完整性,同时使用核酸定量仪(Thermo Fisher Scientific Co., Ltd., Shanghai, China)对其进行定量检测。采用商业的反转录试剂盒(TaKaRa, Dalian, China)进行 cDNA 的合成。将获得的 cDNA 样品进行等体积混合,作为 PCR 扩增的模板。扩增体系包括上游和下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 2  $\mu\text{L}$ , 无菌超纯水 19  $\mu\text{L}$ , Taq PCR 反应混合物(天根生化科技有限公司,北京,中国) 25  $\mu\text{L}$  以及 cDNA 2  $\mu\text{L}$  (50 ng)。采用降落 PCR 程序进行扩增(Eppendorf, Hamburg, Germany),包括  $94^{\circ}\text{C}$ , 3 min;  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 退火(I), 30 s;  $72^{\circ}\text{C}$ , 延伸,按照每个循环降  $1^{\circ}\text{C}$ ,共 16 个循环的速度进行温度的渐降;然后,  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 退火(II), 30 s;  $72^{\circ}\text{C}$ , 延伸;经历 18 个循环;最终  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。其中,各个基因两次退火的温度以及延伸时间见表 1。

将 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,并使用商业试剂盒(天根生化科技有限公司,北京,中国)对目的条带进行纯化,将纯化后的产物连接到 pMD<sup>TM</sup>19-T 克隆载体(TaKaRa, Dalian, China)上,随后导入感受态细胞 DH5 $\alpha$  (天根生化科技有限公司,北京,中国)中,挑取阳性克隆送上海生工生物工程有限公司进行测序,并使用 DNAMAN 进行序列拼接。

## 1.3 序列分析

使用在线软件包(<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>)进行氨基酸序列的翻译,并在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对。使用在线软件 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>)进行蛋白分子量、理论等电点和氨基酸含量的预测。使用 Clustal X2 程序进行氨基酸序列的多重比对分析。采用 MEGA7.0 对目标基因序列进行比对,使用最大似然法构建进化树,bootstrap 值设置为 1000。

## 1.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

使用 Primer 5.0 设计用于 qRT-PCR 的特异性引物(表 1)。正式实验开始之前,先将 cDNA 样品进行梯度稀释以检测引物的扩增效率。按照上述方法,提取总 RNA,并进行 cDNA 的合成。利用 qRT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)对肝脏、肌肉、脑、脾脏、肾脏、肠(前肠、中肠和后肠的等量混合物)、鳃、脂肪和心脏组织目标基因的表达丰度以及禁食状态下目标基因的转录进行分析。每个基因表达的检测包括 3 个重复,采用 20  $\mu\text{L}$  反应体系,10  $\mu\text{mol/L}$  的上游和下游引物各 0.8  $\mu\text{L}$ , 无菌超纯水 7.4  $\mu\text{L}$ , 2 $\times$ Power SYBR<sup>TM</sup> Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Co., Ltd., Shanghai, China) 10  $\mu\text{L}$  以及 cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$  (25 ng)。PCR 扩增程序为  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $95^{\circ}\text{C}$  15 s, 特定温度 1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  1 min, 40 个循环。最后,通过熔解曲线确定产物的单一性。各引物的特定退火温度见表 1。同时,引入两个阴性对照(无 cDNA 和 RNA)进行 qRT-PCR 以确保只有 cDNA 被成功扩增。本研究选取 beta-actin (MH018565.1)作为管家基因对目标基因表达量进行标准化,根据相对定量法<sup>[29-30]</sup>将结果表示为相对于对照组基因表达量的倍数。

表 1 qRT-PCR 引物序列  
Tab. 1 Primers used for qRT-PCR

| 基因 gene        | 上游(5'-3') forward (5'-3') | 下游(5'-3') reverse (5'-3') | 退火温度/℃ annealing |
|----------------|---------------------------|---------------------------|------------------|
| <i>gp1</i>     | TTCAGAGTTCAGAGCGTCCC      | GAAACAAGCAGCCAGACGAC      | 60               |
| <i>gp2</i>     | TGGCTACATTCAGGCGGTTT      | ACCTTGTCAGGCAGTTTGCT      | 60               |
| <i>pepck1</i>  | GGCAAAACCTGCAAGG          | ATAATGGCGTCGATGGGGAC      | 60               |
| <i>pepck2</i>  | CATCAACCCGGAGAATGGCT      | CACAGGGTTCCGCATCTTCT      | 61               |
| <i>hk</i>      | GGGGATGGAAGCAAATCTACAAT   | CACACATACGAGCAGAGCGAGT    | 61               |
| <i>g6p</i>     | CTGGGTGCATCATCAGCTCT      | TCTTGCAAGGACAGCAGG        | 61               |
| <i>pfk</i>     | GGCTGGGCTATGATACAAGAGTGA  | CTCCATTAGAGGCAGACGAACA    | 61               |
| $\beta$ -actin | CTTCTCTCGGTATGGAGTCTTG    | GGTCAGCGATTCCAGGGTA       | 58               |

1.5 统计分析

数据以平均值±标准差( $\bar{x} \pm SD$ )的形式表示。采用 SPSS 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)软件进行单因素方差分析, 并采用 Duncan's 进行多重比较(差异显著:  $P < 0.05$ )。正式统计分析前, 先对数据进行正态性和方差齐性检验。

2 结果与分析

2.1 序列分析

本实验共获得 7 个参与大口黑鲈糖稳态调控相关基因 *gp1*, *gp2*, *pepck1*, *pepck2*, *hk*, *g6p* 和 *pfk* 的完整编码序列(GeneBank 登录号: OQ401776~OQ401782), 全长分别为 2637 bp、2529 bp、1908 bp、1875bp、2757 bp、1017 bp 和 2343 bp, 编码 878、842、635、624、918、338 和 780 个氨基酸。利用 ExPASy 软件预测, GP1 蛋白分子量为 100.63 kD, 理论等电点为 6.28, 富含亮氨酸(9.5%); GP2 蛋白分子量为 97.18 kD, 理论等电点为 6.61, 富含亮氨酸(8.6%); PEPCK1 蛋白分子量为 69.40 kD, 理论等电点为 8.71, 富含甘氨酸(9.6%); PEPCK2 蛋白分子量为 69.19 kD, 理论等电点为 6.07, 富含甘氨酸(8.5%); HK 蛋白分子量为 102.64 kD, 理论等电点为 5.93, 富含亮氨酸(9.9%); G6P 蛋白分子量为 37.91 kD, 理论等电点为 9.21, 富含亮氨酸(11.8%); PFK 蛋白分子量为 84.92 kD, 理论等电点为 6.82, 富含甘氨酸(9.9%)。经过 BLAST 比对分析发现, 这些基因编码的氨基酸序列与其他哺乳动物和硬骨鱼类同源序列具有很高的相似性(表 2)。

表 2 大口黑鲈 *gp1*、*gp2*、*pepck1*、*pepck2*、*hk*、*g6p* 和 *pfk* 基因编码的氨基酸序列与其他物种同源氨基酸序列相似性

Tab. 2 Amino acid sequence identity of *gp1*, *gp2*, *pepck1*, *pepck2*, *hk*, *g6p*, and *pfk* between *Micropterus salmoides* and other species

| 物种 species                            | <i>gp1</i> | <i>gp2</i> | <i>pepck1</i> | <i>pepck2</i> | <i>hk</i> | <i>g6p</i> | <i>pfk</i> | % |
|---------------------------------------|------------|------------|---------------|---------------|-----------|------------|------------|---|
| 人<br><i>Homo sapiens</i>              | 80.48      | 84.64      | 68.31         | 75.48         | 72.51     | 57.42      | 68.07      |   |
| 小鼠<br><i>Mus musculus</i>             | 76.14      | 78.82      | 70.16         | 74.84         | 79.70     | 48.44      | 76.41      |   |
| 大鼠<br><i>Rattus norvegicus</i>        | 80.82      | 83.47      | 70.00         | 75.32         | 82.68     | 55.81      | 67.28      |   |
| 大西洋鲑<br><i>Salmo salar</i>            | 83.69      | 88.48      | 89.45         | 84.32         | 72.68     | 49.30      | 64.06      |   |
| 斑马鱼<br><i>Danio rerio</i>             | 77.79      | 81.55      | 86.64         | 80.90         | 90.70     | 55.56      | 80.05      |   |
| 鳊<br><i>Siniperca chuatsi</i>         | 75.97      | 77.38      | 70.07         | 95.99         | 68.38     | 60.47      | 67.37      |   |
| 石斑鱼<br><i>Epinephelus lanceolatus</i> | 79.84      | 80.00      | 69.80         | 93.59         | 67.07     | 86.35      | 87.95      |   |

2.2 进化树分析

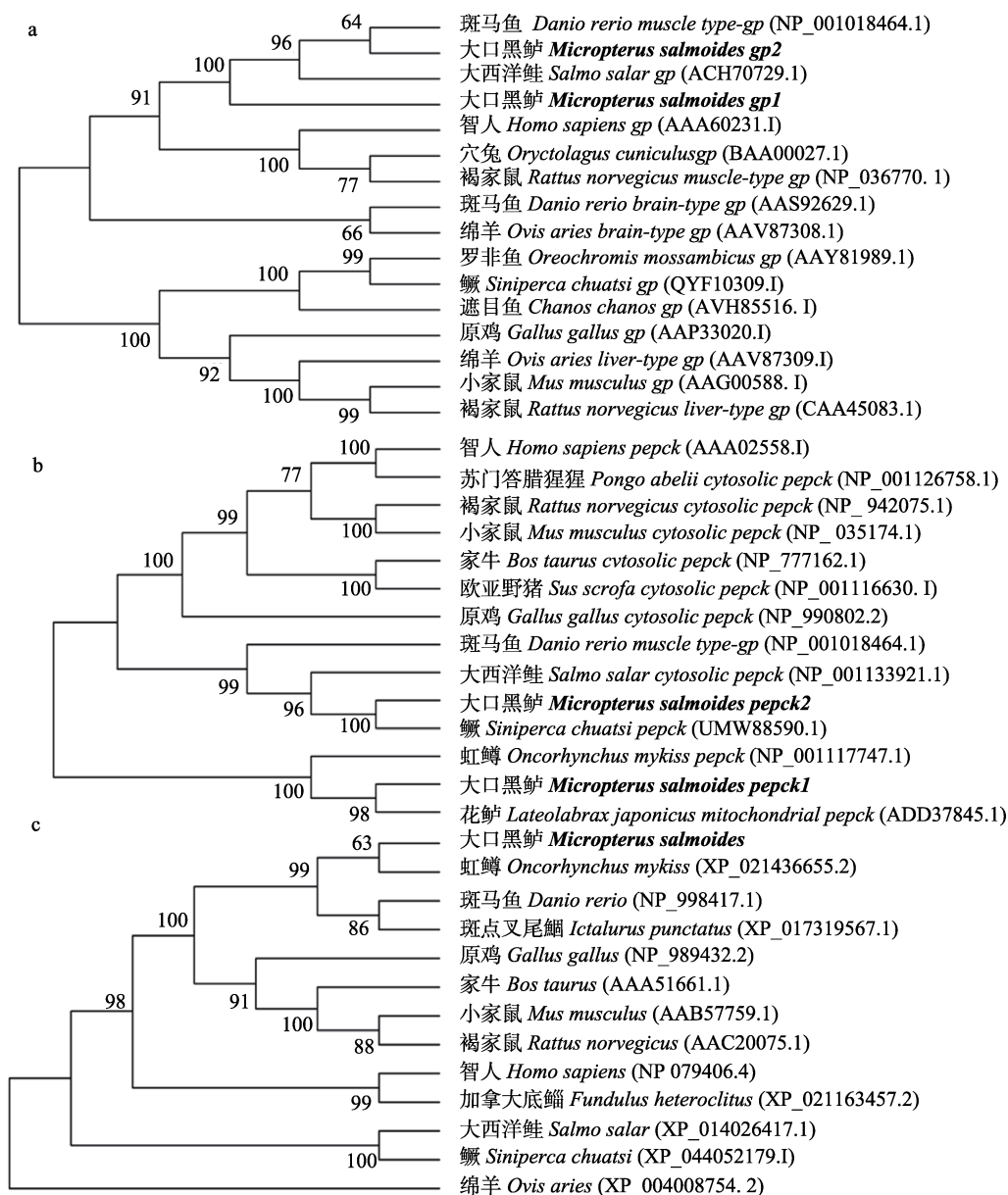
为进一步探究目标基因与其他物种同源基因的进化关系, 于 NCBI 数据库收集来自其他脊椎动物的氨基酸序列构建系统进化树。结果显示, 大口黑鲈的 *gp2* 首先和斑马鱼(*Danio rerio*)聚为一支, 置信值为 64%, 然后与大西洋鲑聚为一支, 之后再与大口黑鲈 *gp1* 形成一个大的分支(图 1a); 总体而言, 鱼类和其他脊椎动物的 *pepck* 分别聚成一支。其中, 大口黑鲈的 *pepck1* 和 *pepck2* 分别以 100%和 98%的置信值与同属鲈形目的花鲈(*Lateolabrax japonicus*)和鳊(*Siniperca chuatsi*)聚成

一支(图 1b); 对于 *hk*, 大口黑鲈和虹鳟形成一支, 置信值为 63%, 再与斑马鱼和斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 形成一个较大的分支(图 1c); 与 *pepck1* 类似, 大口黑鲈的 *g6p* 与同属鲈形目的花鲈聚在一起, 随后依次与牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、鞍带石斑鱼 (*Epinephelus lanceolatus*) 和虹鳟形成一个区别于其他哺乳动物的较大分支 (图 1d); 而大口黑鲈的 *pfk* 则与半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 的 *pfk* 以 100% 的置信值聚成一支, 再和团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)

与斑马鱼 *pfk* 形成一个较大的分支(图 1e)。

### 2.3 组织表达分析

采用 qRT-PCR 方法对大口黑鲈肝脏、肌肉、脑、脾脏、肾脏、肠、鳃、脂肪和心脏组织中 *gp1*、*gp2*、*pepck1*、*pepck2*、*hk*、*g6p* 和 *pfk* 的基因表达水平进行检测。如图 2 所示, 基因层面上, 这些基因总体上广泛表达于各个组织, 但不同基因仍表现出特定的组织表达特性。其中, 参与糖原分解的 *gp1* 和 *gp2* 基因均在肌肉组织表达量最高。此外, *gp1* 在除脾脏外的多个组织均有较为丰富的



(待续 to be continued)

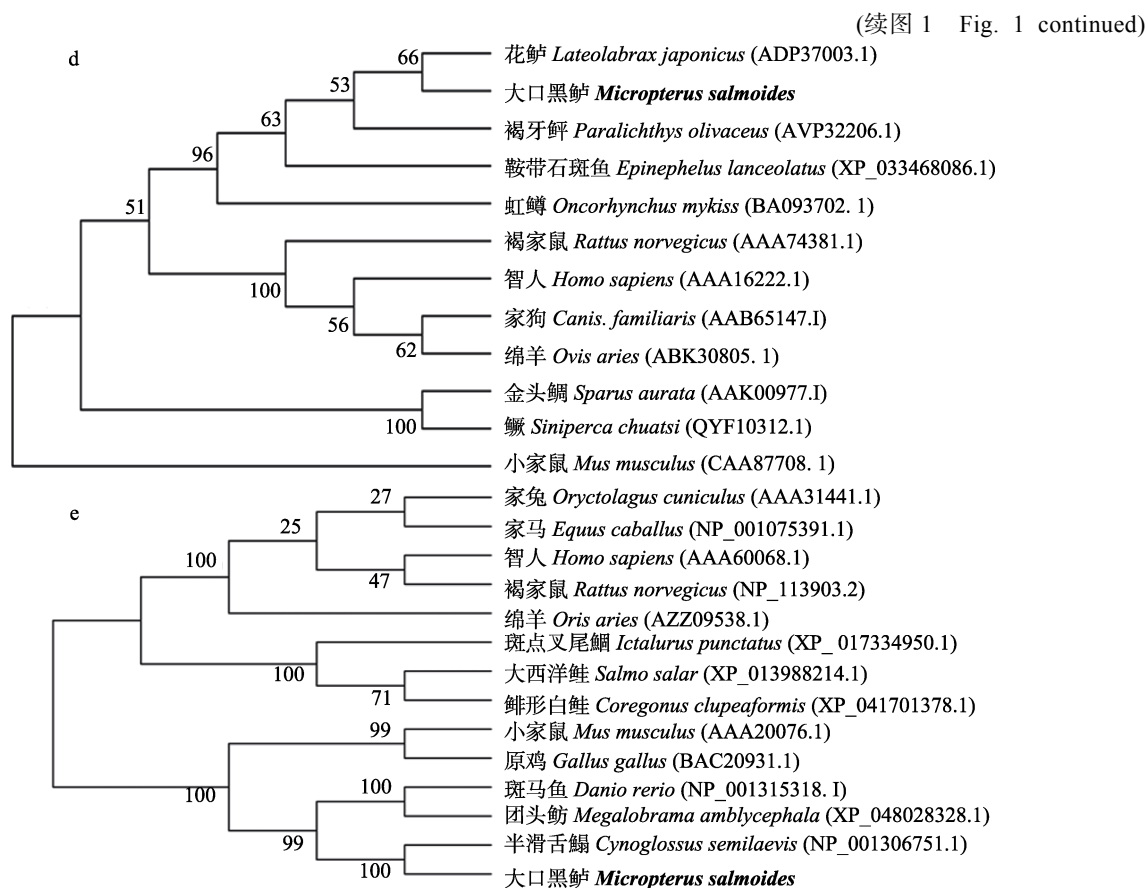


图 1 大口黑鲈和其他脊椎动物 *gp1* (a)、*gp2* (a)、*pepck1* (b)、*pepck2* (b)、*hk* (c)、*g6p* (d)和 *pfk* (e)的系统进化树(最大似然法)

节点处数字表示 1000 次自举检验置信度。

Fig. 1 Phylogenetic tree of *gp1* (a), *gp2* (a), *pepck1* (b), *pepck2* (b), *hk* (c), *g6p* (d), *pfk* (e) from *Micropterus salmoides* and other vertebrate species using the Maximum Likelihood method. Values at branch-points represent percentage frequencies for tree topology after 1000 iterations.

分布,尤其是在肝脏中的表达,仅次于肌肉组织。相较而言,*gp2*则主要集中分布于心脏、肝脏和鳃等少数几个组织中,在其余组织的分布则相对较少;对于糖异生途径限速酶基因,肝脏 *pepck1*、*pepck2*和*g6p*的表达显著高于其余组织。除此之外,*pepck1*依次在肠、鳃、心脏和肌肉呈现较高的mRNA水平,*pepck2*则依次在脑、脂肪、肌肉、心脏和肾脏分布相对丰富,*g6p*基因依次在肌肉、脂肪、肠的转录水平更高。参与糖酵解的*hk*和*pfk*基因,*hk*在肝脏、肌肉和心脏的表达量最高,而在脑、脾脏和脂肪分布最少;与之类似,*pfk*的转录水平也在肝脏和心脏最高,在鳃和肠的转录水平次之,而在其余组织的mRNA水平最低。组织层面的热图显示,这些基因主要集中在肝脏和

肌肉组织进行高表达,而在脑、脾、肾的表达量则相对较低。

## 2.4 禁食对 *gp1*、*gp2*、*pepck1*、*pepck2*、*hk*、*g6p*和*pfk*基因表达的影响

利用qRT-PCR检测实验大口黑鲈肝脏和肌肉组织*gp1*、*gp2*、*pepck1*、*pepck2*、*hk*、*g6p*和*pfk*基因在禁食0、6、12和24h后mRNA水平的变化。如图3所示,对于肝脏中的两个*gp*亚型基因,*gp1*随着禁食时间的延长呈现出先上升后下降的趋势,在禁食第6小时表达量最高,第24小时表达量最低。与之不同,*gp2*的转录随着禁食时间的延长持续增强,第12和24小时的表达明显高于0h。对于肝脏*pepck*,两个亚型表现出不同的变化趋势。*pepck1*的基因表达不受营养状态的显著调节,

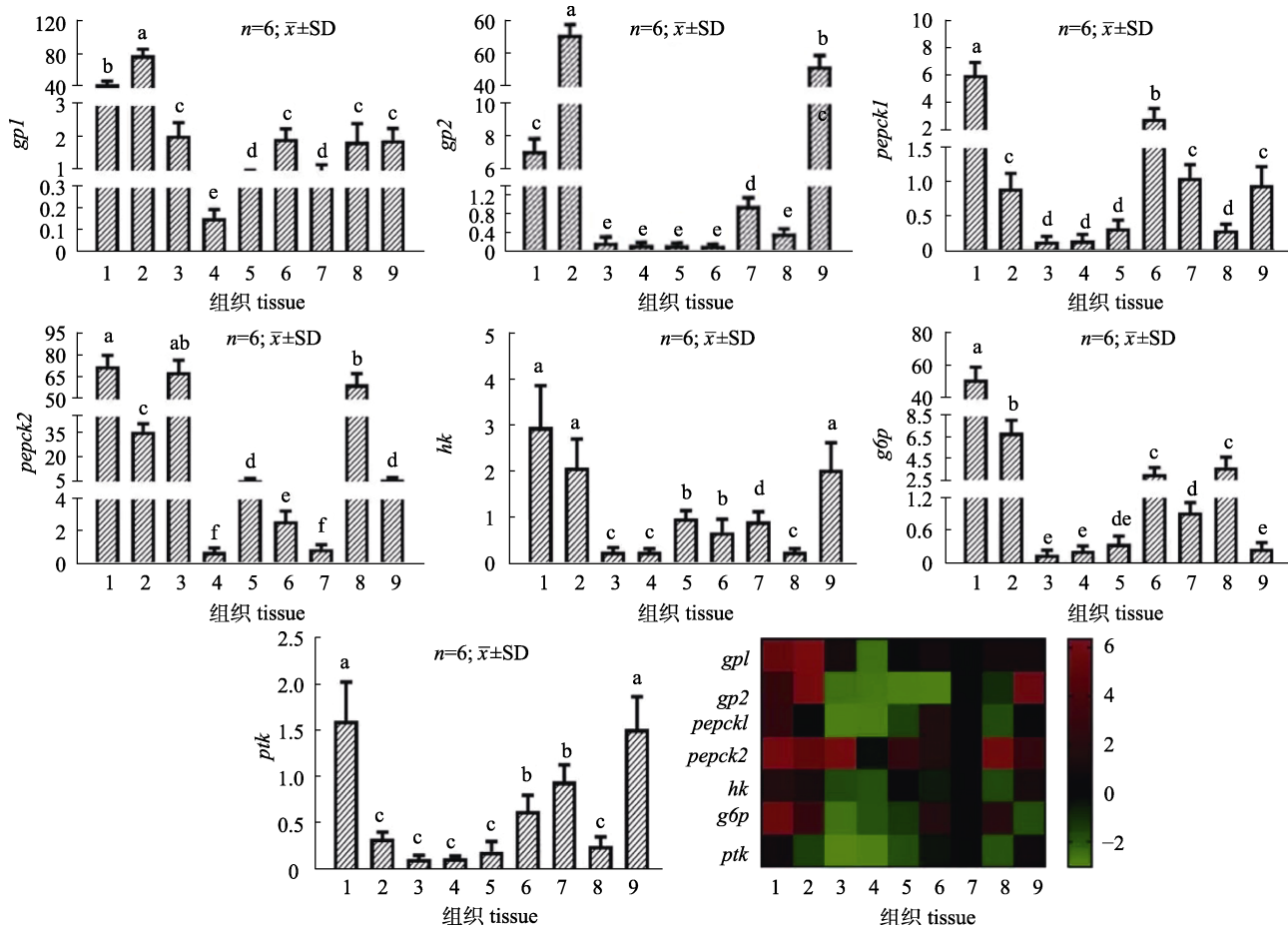


图 2 *Gpl*、*gp2*、*pepck1*、*pepck2*、*hk*、*g6p* 和 *pfk* 基因在大口黑鲈不同组织中的表达丰度

1: 肝; 2: 肌肉; 3: 脑; 4: 脾; 5: 肾; 6: 肠; 7: 鳃; 8: 脂肪; 9: 心脏。鳃为对照组,

不同字母表示该基因表达丰度在不同组织间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 2 Expression abundance of *gpl*, *gp2*, *pepck1*, *pepck2*, *hk*, *g6p* and *pfk* genes in different tissues of *Micropterus salmoides*  
1: liver; 2: muscle; 3: brain; 4: spleen; 5: kidney; 6: intestine; 7: gill; 8: lipid; 9: heart. Gill was defined as the control group.  
Different letters indicate significant differences between the expression abundance in different tissues ( $P < 0.05$ ).

而 *pepck2* 的最低表达量出现在禁食第 0 h。肝脏 *hk* 基因的变化与 *gpl* 一致, 其 mRNA 水平分别在第 6 和 24 小时最高和最低。与 *pepck2* 一样, 禁食 0 h 时 *g6p* 的 mRNA 水平显著低于其他组。*pfk* 的表达随着禁食时间延长出现先升高后降低的趋势, 在禁食第 6 小时出现表达峰值, 直到第 24 小时恢复到 0 h 的转录水平。

肌肉中, *gp* 两个亚型的基因表达均表现出上升的趋势。其中, 每个采样时间点 *gpl* 的表达均显著高于前一时间点。除 0 和 6 h 之间无显著差异外, *gp2* 也表现出相同于 *gpl* 的表达变化模式。总体上, *pepck* 两个亚型也呈现出类似的变化趋势, 即随着禁食时间延长, 表达量逐渐上升。禁食 12

和 24 h 后, *pepck1* 的表达显著高于其余两组, 而 0 h 时最低。禁食 24 h 时 *pepck2* 出现表达峰值。为应对禁食, 参与糖酵解的基因 *hk* 和 *pfk* 表现出先上升后下降的相同变化模式, 分别在第 6 和 0 小时表达量最高和最低。而 *g6p* 的转录则随着禁食时间延长而逐渐增强, 并在第 24 小时达到峰值。

### 3 讨论

本研究分离获得了 7 个参与大口黑鲈糖原分解、糖异生、糖酵解相关过程的限速酶基因。利用氨基酸序列进行多重比对, 发现这些基因与其他脊椎动物同源基因具有很高的相似性。其中, 与硬骨鱼类的相似性 (49.30%~95.99%) 高于与哺

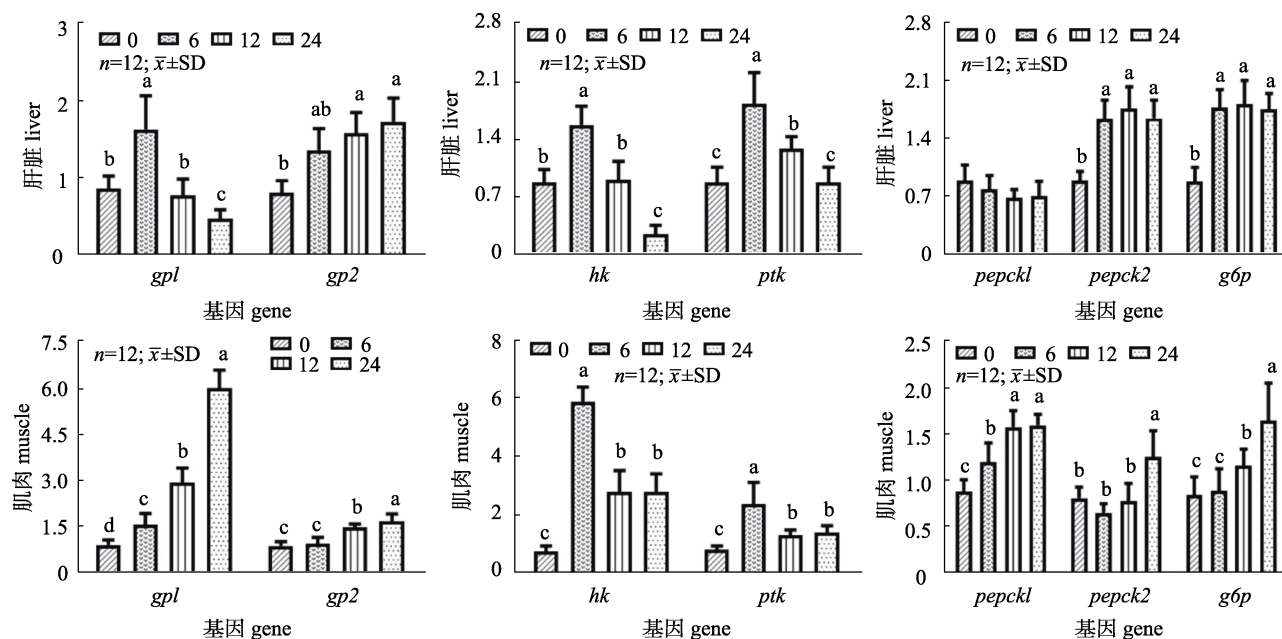


图 3 禁食处理对大口黑鲈 *gpl*、*gp2*、*hk*、*pfk*、*pepck1*、*pepck2* 和 *g6p* 基因表达的影响

0 h 为对照组, 不同字母表示不同时间不同基因表达差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Fig. 3 Effect of fasting on gene expression of *gpl*, *gp2*, *hk*, *pfk*, *pepck1*, *pepck2* and *g6p* in *Micropterus salmoides*. The group 0 h was defined as the control group. Different letters indicate significant differences between gene expression of different genes at different time period ( $P < 0.05$ ).

乳动物的相似性(48.44%~84.64%), 这与进化树分析结果一致, 显示出与鱼类的亲缘关系更近。值得注意的是, 相较于其余 6 个基因, *g6p* 除了与同属鲈形目的石斑鱼具有较高的相似性(86.35%)之外, 与其他脊椎动物的相似性相对较低(48%~61%)。宫官等<sup>[31]</sup>对西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*) *g6p* 氨基酸序列进行同源比对时发现, 其与翘嘴红鲌(*Chanodichthys erythropterus*)和花鲈相似性较高, 分别为 72.7%和 71.8%。然而, 与真鲷(*Pagrus major*)和欧洲鲈的相似性却较低, 分别为 55.3%和 56.9%, 甚至低于与人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)等哺乳动物的相似性。为此, 本研究小组针对同属鲈形目的花鲈和鳊 *g6p* 氨基酸序列也进行了比对, 发现花鲈的 *g6p* 除与同属鲈形目的石斑鱼相似性(91.09%)较高外, 与其余脊椎动物的相似性在 50%~62%之间。而鳊的 *g6p* 与人、小鼠、斑马鱼等的相似性也相对较低(45%~62%)(附图)。以上结果说明 *g6p* 基因序列在种间的差异较大, 进而可能导致功能的多样性, 值得后续进一步研究。

源于至今 2.3~4 亿年前硬骨鱼类的全基因组

加倍现象<sup>[32]</sup>, 鱼类可能较哺乳动物拥有更多的基因亚型, 该现象在大西洋鲑<sup>[33]</sup>、虹鳟<sup>[34]</sup>等鱼类都得到了证实。本研究也分别分离鉴定了 *gp* 和 *pepck* 基因的两个亚型, 这可能是鱼类基因组加倍现象造成的。而在莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)中, 研究人员已成功鉴定了 4 个 *gp* 亚型的存在<sup>[35]</sup>。

利用 qRT-PCR 技术检测目标基因的组织表达分布, 总体结果显示参与糖异生(*pepck1*, *pepck2* 和 *g6p*)和糖酵解的基因主要集中在肝脏组织进行高表达, 这可能与肝脏是物质中间代谢“枢纽”密切相关<sup>[36]</sup>。而涉及糖原分解的限速酶基因 *gpl* 和 *gp2* 则在肌肉组织的表达量最高。肌肉作为机体体重中的最大占比组织, 其糖原含量可能高于肝糖原<sup>[26]</sup>。在低血糖状态下, 肌糖原的大量分解可能是机体维持血糖稳态的主要对策之一, 从而导致 *gpl* 和 *gp2* 在肌肉组织的表达量最高, 这与本研究禁食处理后发现肌肉 *gpl* 和 *gp2* 基因的表达持续上调的结果相符。具体而言, 不同基因在同一组织内的分布差异较大, 而同一基因在不同组织间的表达丰度也不一致, 显示出分布的独特

性。例如, 肌肉组织中, *gp1*、*g6p* 等的表达相对较高, 而 *pfk* 的 mRNA 水平却相对较低; *hk* 基因除在肝脏、肌肉和心脏组织表达较为丰富外, 在其余组织的表达量均较低。早在 1980 年, Knox 等<sup>[37]</sup>在硬头鳟(*Salmo gairdneri*)、大西洋鳕(*Gadus morhua*)和欧洲鳎(*Pleuronectes platessa*)的研究中已指出, *hk*、*pfk*、*pecpk* 等糖代谢相关基因的表达具有物种和组织特异性。李淑云等<sup>[38]</sup>发现卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)的 *pecpk* 主要在肝脏和肾脏组织高表达, 而在肠道和心脏表达量较低; 而云斑尖塘鳢(*Oxyeleotris marmoratus*)的 *pecpk* 主要在肝脏表达, 在肌肉和脑等组织的表达较低<sup>[39]</sup>。类似地, 中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)的 *hk* 主要分布在性腺<sup>[40]</sup>, 而牡蛎(*Crassostrea angulata*)的 *hk* 几乎不在性腺表达<sup>[41]</sup>。基因在组织和物种间的差异表达暗示了功能上的差异。在小鼠中, 敲除 *pecpk* 基因会导致其出现明显的低血糖症而死亡<sup>[42-43]</sup>; 然而, 抑制 *hk* 的表达则会降低细胞对葡萄糖的酵解<sup>[44]</sup>。即使同一基因, 在不同物种间的功能也不一样。杨莹<sup>[45]</sup>研究发现, 在高糖日粮饲喂条件下, 瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)的 *pecpk* 基因会受到显著抑制; 然而, 虹鳟的 *pecpk* 基因却不受日粮糖水平的影响<sup>[46]</sup>。大口黑鲈基因在组织和物种间分布的独有特性暗示了其特有的功能特性, 更多针对性的深入研究需要进一步开展。

肝脏是机体中间物质代谢的中心<sup>[36]</sup>, 而肌肉则是养殖鱼类机体中最大的部位, 因此, 肝脏和肌肉组织是反映养殖鱼类糖稳态调节的重要组织。糖原是碳水化合物在机体的主要储存形式, 且主要以肝糖原和肌糖原的形式存在<sup>[22]</sup>。Molayemraftar 等<sup>[47]</sup>对银鲷(*Sparidentex hasta*)进行禁食后发现, 鱼体在食物匮乏情况下会分解糖原以维持血糖稳态。在南方鲷的研究中也发现, 饥饿条件下, 肝糖原和肌糖原含量会显著下降<sup>[48]</sup>。然而, 在诸如鳕、鲤等多种鱼的研究也发现, 在饥饿期间, 脂肪“储备”会优先于糖原被动用<sup>[22]</sup>。本研究中, 肌肉组织中编码糖原分解的 *gp1* 和 *gp2* 基因以及肝脏 *gp2* 基因的转录随着禁食而出现快速显著的增强, 表明大口黑鲈在禁食条件下可能偏

向于优先动用糖原进行分解供能。值得注意的是, 肝脏组织 *gp1* 的表达随着禁食时间的延长出现先升后降的趋势, 表明大口黑鲈 *gp1* 和 *gp2* 基因出现了功能上的分化, 但具体的差异还需进一步研究, 类似的研究结果在罗非鱼上也有报道<sup>[35]</sup>。糖异生是机体利用甘油、乳酸等非糖物质合成葡萄糖的过程。研究人员在鲤中发现, 随着禁食时间延长, 鱼体 PEPCK 的酶活性和基因表达均显著提高<sup>[49]</sup>。卵形鲳鲹中也同样发现, 饥饿状态下 PEPCK 的酶活性和基因表达较饲喂状态均有所提高<sup>[50]</sup>。而本研究结果也显示, 肝脏和肌肉组织中糖异生途径相关限速酶基因 *pecpk* 和 *g6p* 的转录随饥饿时间延长而增强。然而, 肝脏 *pecpk1* 亚型却出现了不同的表达模式, 即并不受营养状态的调节。据报道, *pecpk* 存在线粒体型和胞质型两种亚型。其中, 胞质型受到激素、日粮等的调节, 而线粒体型几乎是构成式的, 不受调节<sup>[51]</sup>。目前, 两种亚型在鱼上均已被成功克隆<sup>[50,52]</sup>。因此, 推测本研究中克隆获得的 *pecpk1* 有可能是线粒体型, 这与进化树分析结果中大口黑鲈 *pecpk1* 和花鲈的线粒体型 *pecpk* 聚为一支的结果相对应。此外, 肌肉组织 *pecpk* 两个亚型均对禁食处理在基因表达层面出现了相似的分子反应。而肝脏中 *pecpk1* 并不和 *pecpk2* 一样受到调节, 表明肌肉和肝脏组织中 *pecpk* 两个亚型对糖异生的贡献率并不相同, 这与研究人员在鸡(*Gallus gallus domesticus*)中的发现类似。该研究指出, 在鸡肝脏中, 几乎所有的 PEPCK 活性均归功于线粒体型 *pecpk*, 而肾脏中胞质型和线粒体型 PEPCK 的活性相当<sup>[53]</sup>。在禁食和运动期间, 糖异生和糖原分解是机体补充血糖的主要方式<sup>[54]</sup>。其中, 糖原分解可以为糖酵解提供葡萄糖<sup>[22]</sup>。在禁食初期, 随着糖原分解的增强, 机体利用从糖原分解中获取的葡萄糖进行氧化磷酸化(即糖酵解), 导致在短期禁食(6 h)内肌肉和肝脏中糖酵解相关限速酶基因 *hk* 和 *pfk* mRNA 水平达到峰值。然而, 随着禁食时间的持续, 糖原储存逐渐耗尽, 糖异生占据主导地位, 导致糖酵解的“原料减少”, 因而在禁食 6 h 后 *hk* 和 *pfk* 的转录逐渐下降。

综上所述, 本研究分离鉴定了 7 个(*gp1*、*gp2*、

*pepck1*、*pepck2*、*hk*、*g6p*、*pfk*)参与大口黑鲈糖稳态调控分子的完整编码序列。进化树分析结果表明这些基因与其他物种的同源物具有较高的相似性;组织表达谱结果显示这些基因在各个组织中均有不同程度的表达丰度,但总体集中在肝脏和肌肉组织中,而同一组织中不同基因以及同一基因在不同组织中的特定表达模式也反映出这些基因不同的生理功能以及功能的组织特异性;通过检测禁食对这些基因 mRNA 水平的影响发现,大口黑鲈会在禁食过程中同时通过糖原分解和糖异生作用维持血糖稳定。在短期禁食内,大口黑鲈仍以葡萄糖为原料进行糖酵解供能。然而,随着禁食的持续、糖原储存逐渐消耗,糖酵解减弱,鱼体可能通过其他方式(如脂肪分解等)进行能量供应。

#### 参考文献:

- [1] The People's Republic of China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Fisheries Bureau, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook 2020[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021. [中华人民共和国农业农村部渔业局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.]
- [2] Webster C D, Lim C. Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture[M]. New York: CABI publishing, 2002: 1-27.
- [3] United States National Research Council. Nutrients requirements of fish and shrimp[M]. Mai K S, Li P, Zhao J M, et al (translate). Beijing: China Science Publishing, 2015: 147-170. [美国科学院国家研究委员会. 鱼类与甲壳类营养需要[M]. 麦康森, 李鹏, 赵建民, 等(译). 北京: 科学出版社, 2015: 147-170.]
- [4] Liu Z K, Chen N S, Wang M L, et al. Suitable dietary starch source and supplementation level for largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(2): 317-331. [刘子科, 陈乃松, 王孟乐, 等. 大口黑鲈饲料中适宜的淀粉源及添加水平[J]. 中国水产科学, 2017, 24(2): 317-331.]
- [5] Amoah A, Coyle S D, Webster C D, et al. Effects of graded levels of carbohydrate on growth and survival of largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2008, 39(3): 397-405.
- [6] Gou S P, Chen N S, Xu X T, et al. Effects of dietary digestible starch levels on growth performance, body composition, and non-specific immunological index of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(10): 1499-1510. [苟仕潘, 陈乃松, 徐祥泰, 等. 饲料中可消化淀粉对大口黑鲈生长、体组成和非特异性免疫指标的影响[J]. 水产学报, 2015, 39(10): 1499-1510.]
- [7] Zhu Z M, Zhu W M, Lan H B. The biological characteristics and nutritional requirement of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Feed Industry, 2014, 35(16): 31-36. [朱志明, 朱旺明, 蓝汉冰. 加州鲈(*Micropterus salmoides*)生物学特性和营养需求研究进展[J]. 饲料工业, 2014, 35(16): 31-36.]
- [8] Zhao L L, Liang J, Chen F K, et al. High carbohydrate diet induced endoplasmic reticulum stress and oxidative stress, promoted inflammation and apoptosis, impaired intestinal barrier of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2021, 119: 308-317.
- [9] Deng D F, Refstie S, Hung S S O. Glycemic and glycosuric responses in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) after oral administration of simple and complex carbohydrates[J]. Aquaculture, 2001, 199(1-2): 107-117.
- [10] Luo Y P, Xie X J. Progress of carbohydrate utilization in fish[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(2): 381-390. [罗毅平, 谢小军. 鱼类利用碳水化合物的研究进展[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 381-390.]
- [11] Halver J E. Fish Nutrition[M]. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1989.
- [12] Polakof S, Mommsen T P, Soengas J L. Glucosensing and glucose homeostasis: From fish to mammals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 160(4): 123-149.
- [13] Zhou C P, Lin H Z, Huang Z, et al. Molecular characterization, expression and activity of glucokinase in golden pompano, *Trachinotus ovatus*: Response of its expression to carbohydrate in the diet[J]. Aquaculture, 2018, 485: 124-130.
- [14] Hou Y, Hou Y B, Yao L, et al. Effects of chilled trash fish and different carbohydrate levels in puffed feed on growth performance and glucose metabolism of snakehead[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2018, 44(2): 199-208. [侯涌, 侯艳彬, 姚垒, 等. 冰鲜鱼和膨化饲料中不同糖类水平对乌鳢生长性能及糖代谢的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2018, 44(2): 199-208.]
- [15] Su J Z, Mei L Y, Xi L W, et al. Responses of glycolysis, glycogen accumulation and glucose-induced lipogenesis in grass carp and Chinese longsnout catfish fed high-carbohydrate diet[J]. Aquaculture, 2021, 533: 736146.
- [16] Su J Z, Gong Y L, Mei L Y, et al. The characteristics of

- glucose homeostasis in grass carp and Chinese longsnout catfish after oral starch administration: A comparative study between herbivorous and carnivorous species of fish[J]. The British Journal of Nutrition, 2020, 123(6): 627-641.
- [17] Lin X Z, Luo Y P, Xie X J. Effect of dietary carbohydrate level on glycolytic enzymes and serum glucose concentrations in the juvenile southern catfish after feeding[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 30(3): 304-310. [林小植, 罗毅平, 谢小军. 饲料碳水化合物水平对南方鲇幼鱼餐后糖酵解酶活性及血糖浓度的影响[J]. 水生生物学报, 2006, 30(3): 304-310.]
- [18] Liu X W, Xu T T, Huang Y H, et al. Research progress in carbohydrate nutrition of Fish (Part 1)[J]. Scientific Fish Farming, 2021, 70-72. [刘兴旺, 徐田田, 黄燕华, 等. 鱼碳水化合物营养研究进展(上)[J]. 科学养鱼, 2021, 70-72.]
- [19] Kirchner S, Panserat S, Lim P L, et al. The role of hepatic, renal and intestinal gluconeogenic enzymes in glucose homeostasis of juvenile rainbow trout[J]. Journal of Comparative Physiology B, 2008, 178(3): 429-438.
- [20] Bou M, Todorčević M, Fontanillas R, et al. Adipose tissue and liver metabolic responses to different levels of dietary carbohydrates in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2014, 175: 72-81.
- [21] Nie Q, Miao H J, Miao S Y, et al. Effects of dietary glucose and dextrin on activity and gene expression of glucokinase and fructose-1, 6-bisphosphatase in liver of turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2015, 41(3): 819-832.
- [22] Halver J E, Hardy R W. Fish Nutrition[M]. 3rd ed. San Diego, Calif.: Academic Press, 2002.
- [23] Ekmann K S, Dalsgaard J, Holm J, et al. Effects of dietary energy density and digestible protein: Energy ratio on *de novo* lipid synthesis from dietary protein in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) quantified with stable isotopes[J]. The British Journal of Nutrition, 2013, 110(10): 1771-1781.
- [24] Conde-Sieira M, Soengas J L, Valente L M P. Potential capacity of senegalese sole (*Solea senegalensis*) to use carbohydrates: Metabolic responses to hypo- and hyperglycaemia[J]. Aquaculture, 2015, 438: 59-67.
- [25] Hemre G I, Mommsen T P, Krogdahl. Carbohydrates in fish nutrition: Effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes[J]. Aquaculture Nutrition, 2002, 8(3): 175-194.
- [26] Kamalam B S, Medale F, Panserat S. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies[J]. Aquaculture, 2017, 467: 3-27.
- [27] Enes P, Panserat S, Kaushik S, et al. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2009, 35(3): 519-539.
- [28] Shao J Q, Du J X, Lei C X, et al. Development of genes and SNP markers related to food domestication based on largemouth bass transcriptome[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(3): 421-434. [邵嘉祺, 杜金星, 雷彩霞, 等. 基于转录组测序筛选大口黑鲈食性驯化相关基因和 SNP 标记[J]. 中国水产科学, 2022, 29(3): 421-434.]
- [29] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [30] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(9): e45.
- [31] Gong G, Xue M, Wang J, et al. Cloning and sequence analysis of full-length cDNAs of key enzymes of gluconeogenesis in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(7): 1504-1518. [宫官, 薛敏, 王嘉, 等. 西伯利亚鲟糖异生途径关键酶基因全长 cDNA 的克隆和序列分析[J]. 动物营养学报, 2013, 25(7): 1504-1518.]
- [32] Vandepoele K, De Vos W, Taylor J S, et al. Major events in the genome evolution of vertebrates: Paraneome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(6): 1638-1643.
- [33] Lai Y Y Y, Lubieniecki K P, Koop B F, et al. Characterization of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) brain-type fatty acid binding protein (fabp7) genes reveals the fates of teleost fabp7 genes following whole genome duplications[J]. Gene, 2012, 504(2): 253-261.
- [34] Bayır M, Bayır A, Wright J M. Divergent spatial regulation of duplicated fatty acid-binding protein (*fabp*) genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2015, 14: 26-32.
- [35] Tseng Y C, Huang C J, Chang J C H, et al. Glycogen phosphorylase in glycogen-rich cells is involved in the energy supply for ion regulation in fish gill epithelia[J]. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2007, 293(1): R482-R491.
- [36] Kolditz C I, Paboeuf G, Borthaire M, et al. Changes induced by dietary energy intake and divergent selection for muscle fat content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), assessed by transcriptome and proteome analysis of the liver[J]. BMC

- Genomics, 2008, 9: 506.
- [37] Knox D, Walton M J, Cowey C B. Distribution of enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in fish tissues[J]. Marine Biology, 1980, 56(1): 7-10.
- [38] Li S Y, Liu H Y, Tan B P, et al. Effects of dietary carbohydrate levels on the gene expression and the activity of pepck in marine fishes with different food habits[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(1): 80-89. [李淑云, 刘泓宇, 谭北平, 等. 饲料中糖水平对不同食性海水鱼类 PEPCK 基因表达和酶活性的影响[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 80-89.]
- [39] Zhang Y F. Cloning of key genes of sugar metabolism in *Oxyelenchus yunnanensis* and their changes during starvation and re-feeding[D]. Guangzhou: South China Normal University, 2015. [张宇飞. 云斑尖塘鳢糖代谢关键基因的克隆及在饥饿再投食时的变化[D]. 广州: 华南师范大学, 2015.]
- [40] Wu B Q, Cui D Y, Jiao R H, et al. Cloning of hexokinase gene from *Strongylocentrotus intermedius* and its expression response to high temperature-acidification stress[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2022, 24(7): 205-217. [武博琼, 崔东遥, 焦仁和, 等. 中间球海胆己糖激酶基因克隆及高温-酸化胁迫对其表达影响的初步研究[J]. 中国农业科技导报, 2022, 24(7): 205-217.]
- [41] Zeng Z, Ni J B, Ke C H. Glycogen content relative to expression of glycogen phosphorylase (*GPH*) and hexokinase (*HK*) during the reproductive cycle in the Fujian Oyster, *Crassostrea angulata*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2015, 34(6): 66-76.
- [42] She P, Shiota M, Shelton K D, et al. Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism[J]. Molecular and Cellular Biology, 2000, 20(17): 6508-6517.
- [43] She P X, Burgess S C, Shiota M, et al. Mechanisms by which liver-specific PEPCK knockout mice preserve euglycemia during starvation[J]. Diabetes, 2003, 52(7): 1649-1654.
- [44] Jiao N, Ji W S, Zhang B, et al. Overexpression of protein phosphatase 2 regulatory subunit B $\alpha$  promotes glycolysis by regulating hexokinase 1 in hepatocellular carcinoma[J]. Biomedical and Environmental Sciences: BES, 2022, 35(7): 622-632.
- [45] Yang Y. Effect of dietary carbohydrate level on growth performance and mRNA expression of several carbohydrate metabolism genes in juvenile darkbarbel catfish, *Pelteobagrus vachelli*[D]. Shanghai: East China Normal University, 2011. [杨莹. 日粮糖水平对瓦氏黄颡鱼幼鱼生长和糖代谢相关酶基因表达的影响[D]. 上海: 华东师范大学, 2011.]
- [46] Ren M C. Studies on nutritional physiology of carbohydrate for 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.]
- [47] Molayemraftar T, Kochanian P, Zakeri M, et al. Effects of short-term starvation on biochemical carcass composition, liver glycogen and fat in Silver seabream fingerlings, *Sparidentex hasta*[J]. AquaDocs, 2014, 12(4): 60-70.
- [48] Fan G Y, Li Y W. Effects of starvation on metabolism of glucose in juvenile *Silurus meridionalis*[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2011, 28(3): 22-27. [范国燕, 李英文. 饥饿胁迫对南方鲇幼鱼糖代谢的影响[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2011, 28(3): 22-27.]
- [49] 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]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 2002, 1579(1): 35-42.
- [50] Li R X, Liu H Y, Li S Y, et al. Nutritional regulation of gene expression and enzyme activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase in the hepatic gluconeogenesis pathway in golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. Aquaculture Research, 2019, 50(2): 634-643.
- [51] Hanson R W, Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (*GTP*) gene expression[J]. Annual Review of Biochemistry, 1997, 66: 581-611.
- [52] Panserat S, Plagnes-Juan E, Brèque J, et al. Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. The Journal of Experimental Biology, 2001, 204(Pt 2): 359-365.
- [53] Stark R, Kibbey R G. The mitochondrial isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) and glucose homeostasis: Has it been overlooked?[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2014, 1840(4): 1313-1330.
- [54] Gerich J E. Physiology of glucose homeostasis[J]. Diabetes, Obesity & Metabolism, 2000, 2(6): 345-350.

## Molecular cloning, characterization, and nutritional regulation of glucose homeostasis genes in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

LEI Caixia<sup>1</sup>, SONG Hanru<sup>2</sup>, FU Hao<sup>1</sup>, XIE Yujing<sup>1</sup>, LI Shengjie<sup>1</sup>

1. Pearl River Fisheries Research Institute, China Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Life Science, Huzhou University, Huzhou 313000, China

**Abstract:** To investigate the regulation of glucose homeostasis in *Micropterus salmoides*, we cloned genes *gp1*, *gp2*, *pepck1*, *pepck2*, *hk*, *pfk*, and *g6p* encoding 878, 842, 635, 624, 918, 780, and 338 amino acid residues. We also examined the phylogenetic tree, tissue distribution, and effect of fasting on the expression of these genes. Results from multiple protein sequence alignments and phylogenetic analysis showed that these genes shared high levels of identity with their orthologs in other vertebrates. Tissue profiles of these genes revealed enrichment in the liver and muscle, but with unique tissue expression differences. For example, *gp1* was highly expressed in the muscle, followed by the liver, and the lowest expression level was observed in the spleen. *gp2* was also highly expressed in the muscle and abundant in the heart and liver. *pepck1* was mainly expressed in the liver and intestines, with the lowest mRNA levels in the brain, spleen, kidney, and adipose tissue. *pepck2* was more significantly expressed in the liver and brain than in the other tissues, whereas the lowest mRNA levels were found in the spleen and gills. Additionally, *hk* and *g6p* were most abundantly expressed in the liver, and *pfk* in the liver and heart. The *g6p* gene was also the most abundantly expressed in the liver. The muscle, intestines, and adipose tissue were also enriched with an abundance of *g6p*. The highest expression levels of *pfk* were found in the liver and heart, followed by the intestines and gills. We examined the effect of fasting on the mRNA levels of these genes in *Micropterus salmoides*. The results showed that hepatic *gp2*, *pepck2*, and *g6p* mRNA levels were gradually up-regulated with increasing fasting time, peaking at 24 h after fasting. However, *gp1*, *hk*, and *pfk* exhibited diverse gene expression patterns, with transcription first increasing and then decreasing with the extension of fasting time, peaking at 6 h. Hepatic *pepck1* was not significantly affected throughout the fasting period. In the muscle, *gp1*, *gp2*, and *g6p* mRNA expression increased significantly at 12 h, with *pepck1* showing the lowest expression at 0 h and the highest expression at 12 and 24 h. After fasting for 24 h, *pepck2* showed the highest mRNA level. Muscular *hk* and *pfk* showed a similar expression pattern with hepatic *gp1*, *hk*, and *pfk*, increasing and then decreasing with fasting time. Overall, these findings provide groundwork for future studies focusing on glucose homeostasis regulation in *Micropterus salmoides*.

**Key words:** *Micropterus salmoides*; glucose homeostasis gene; cloning; expression analysis; nutritional regulation

**Corresponding author:** LI Shengjie. Email: ssjjli@163.com