

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00276

草鱼小肽转运载体 *PepT1* 基因的克隆与表达特征

冯军厂^{1,3}, 刘臻^{1,2}, 鲁双庆^{1,2}, 聂国兴³, 周玲^{1,2}, 孙浪^{1,2}

1. 长沙学院 生物技术与营养研究所, 湖南 长沙 410003;

2. 长沙学院 生物工程与环境科学系, 湖南 长沙 410003;

3. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007

摘要: 采用同源克隆和 RACE 技术克隆草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)*PepT1* 基因的全长 cDNA 序列。该 cDNA 全长为 2 762 bp, 包含 141 bp 的 5'UTR 序列, 479 bp 的 3'UTR 序列, 2 142 bp 开放阅读框, 编码 713 个氨基酸; 草鱼与鲫(*Carassius auratus*)、斑马鱼(*Danio rerio*) 的核苷酸同源性分别为 77.6% 和 74.0%, 氨基酸同源性分别为 78.0% 和 76.7%; 与其他物种的核苷酸同源性为 53.9%~59.1%, 而氨基酸的同源性为 57.2%~61.8%。经预测, 其编码蛋白的分子量为 79.29 kD, 等电点为 5.87, 该蛋白具有与哺乳动物十分相似的 11 个螺旋跨膜结构, 跨膜区氨基酸高度保守; 系统进化分析表明, 草鱼 *PepT1* 基因与鲫鱼和斑马鱼的亲缘关系最近; 利用 Real-time PCR 技术检测了该基因的时空表达, 结果显示, *PepT1* 在草鱼前肠组织表达量最高, 其次是肌肉组织; 草鱼出膜 7 d 后 *PepT1* mRNA 表达量相对稳定; 昼夜节律研究发现, 肠道 *PepT1* 基因夜间的表达量较白天高。本研究旨在为小肽转运载体 *PepT1* 介导肠道转运小肽调控草鱼对饲料蛋白消化吸收的分子机理提供理论基础。

关键词: 草鱼; *PepT1* cDNA; 分子特征; mRNA 表达丰度

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)02-0276-10

在鱼类饲料中, 蛋白质是最为关键性的营养物质, 提高蛋白质的利用率不仅会降低养殖成本, 而且会减少氮对环境的污染。研究表明, 小肠上皮细胞对饲料蛋白的吸收起着重要的作用, 这种生理活动主要依赖于肠道上皮细胞转运载体基因的作用^[1]。小肽转运载体的研究最早可以追溯到 1953 年^[2], 而直到 1994 年, Fei 等^[3]才首次成功克隆了兔小肠小肽转运载体, 并将其命名为 I型肽转运载体(PepT1)。目前关于小肽转运载体研究较多的主要集中在畜禽等动物小肽转运载体基因的分子结构与功能关系的研究^[4~10], 鱼类在这方面的研究还较少, 只见斑马鱼(*Danio rerio*, AY300011)、*Sebastodes Nebulosus*(EU160494), 大西洋鳕(*Gadus morhua*, AY921634)、欧洲黑鲈(*Dicentrarchus*

labrax, FJ237043)、鲤(*Cyprinus carpio*, EU328390)和鲫(*Carassius auratus*)等^[11], 这些研究为进一步认识鱼类小肽转运载体基因及其功能奠定了基础。

小肽转运载体 *PepT1* 在动物组织中表达有着重要的生理意义, *PepT1* mRNA 表达水平既能反映细胞 *PepT1* 蛋白量的表达, 也体现 *PepT1* 的转运活性^[12]。本实验室的早期研究已经发现, *PepT1* 基因主要在鲫成体肠道前段表达, 并沿着肠道纵轴方向表达水平逐渐降低, 这为鲫肠道吸收蛋白质的肠段分区提供了理论依据^[13], 然而, 在鱼类早期发育阶段, *PepT1* 基因的表达模式, 以及鱼类肠道 *PepT1* 昼夜节律的表达规律研究依然尚未见报道, 深入开展这些研究, 将有利于揭示鱼类 *PepT1* 对小肽转运的分子机理认识。因此, 本研

收稿日期: 2012-05-13; 修订日期: 2012-08-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31001114); 湖南省高校产业化培育项目(10CY017).

作者简介: 冯军厂(1986-), 男, 硕士研究生; 研究方向为分子与营养. E-mail: fjc15290022@126.com

通信作者: 刘臻, 博士, 副教授. E-mail: 25300085@qq.com

究拟采用同源克隆和 RACE 技术获得草鱼肠道小肽转运载体 *PepT1* cDNA 的全长序列, 对其 cDNA 序列和推导的氨基酸及蛋白进行了分析, 并首次采用实时荧光定量 PCR 技术分析了该基因在草鱼早期发育时期、不同组织及昼夜节律的表达的变化规律, 为小肽转运载体 *PepT1* 基因功能与结构的关系及其在生物体内转运小肽的分子机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 健康无病草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)30尾, 平均体长16.5 cm, 平均体质量55.0 g; 发育变化研究所用的受精卵及鱼苗, 均购于湖南省水产科学研究所。

1.1.2 主要试剂 E.Z.N.A.TM Total RNA Kit RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒购于 Fermentas; Top10 感受态细胞和 pGM-T 载体购于 TIANGEN; 末端转移酶(TdT)、dATP、TaKaRa DNA Fragment Purification Kit Ver210 和 SYBR[®] Premix Ex Taq TM 购于 TaKaRa。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 取草鱼鲜活肠组织, 用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, -20℃保存备用。

1.2.2 *PepT1* cDNA 中间片段克隆 从 GenBank 中下载相关序列, 用 DNAMAN 分析保守性, 在保守区内用 Premier5.0 设计特异性引物 P(表 1), 引物由上海英骏合成。以提取的总 RNA 为模板, 按逆转录试剂盒操作说明逆转录成第一条 cDNA 链。PCR 扩增条件为 95℃预变性 3 min; 94℃ 30 s, 48℃ 30 s, 72℃ 90 s, 共 30 个循环; 72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳、切胶和回收纯化后克隆至 pGM-T 载体, 转化到感受态 Top10, 进行蓝白斑筛选, 菌液 PCR 检测阳性克隆送上海英骏测序。

1.2.3 3'端片段克隆 扩增时共设计 4 条引物, GSPP1、NGSPP1、3'RACE Olig(T)-Adaptor 和 3'RACE Adaptor, 其中 GSPP1 和 NGSPP1 是根据已获得中间片段序列而设计的特异性引物, 并且

GSPP1 在 NGSPP1 的上游; 3'RACE Olig(T)-Adaptor 和 3'RACE Adaptor 是一对通用引物。反转录时, 用 3'RACE Olig(T)-Adaptor 代替反转录试剂盒中的 Olig(T)用于 mRNA 反转录; 扩增时, 用 GSPP1 和 3'RACE Adaptor 做第一次 PCR, 扩增条件: 94℃预变性 3 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 60 s, 共 20 个循环; 72℃延伸 10 min。产物稀释 50 倍后再用 NGSPP1 和 3'RACE Adaptor 做巢式 PCR, 反应条件同上。PCR 产物验证同中间片段的克隆。

1.2.4 5'端片段克隆 扩增时共设计 4 条引物, GSPP2、NGSPP2、5'RACE Olig(T)-Adaptor 和 5'RACE Adaptor, 其中 GSPP2 和 NGSPP2 是根据已获得中间片段序列而设计的特异性引物, 并且 GSPP2 在 NGSPP2 的下游; 5'RACE Olig(T)-Adaptor 和 5'RACE Adaptor 是一对通用引物。首先, 反转录, 用特异性引物 GSPP2 代替反转录试剂盒中的 Olig(T)在 Mulv 逆转录酶的作用下合成 cDNA 的第一链, 用 DNA Fragment Purification Kit Ver.2.0(Code: DV807A)纯化试剂盒将 cDNA 纯化; 其次, 在纯化产物 cDNA 3'端加一个 Poly(A)尾巴。取纯化 cDNA 10 μL, 5×TdT buffer 10 μL, 0.1% BSA 5 μL, dATP (10 mmol/L) 2.5 μL, TdT 酶 1 μL, H₂O 21.5 μL, 37℃保温 30 min 后 80℃终止反应 3 min, 产物用 H₂O 稀释为 0.5 mL 后 -20℃保存备用。最后, 巢式 PCR。方法步骤同 3'端片段克隆。PCR 产物验证同中间片段的克隆。

1.2.5 不同发育阶段的表达差异性分析 在湖南省水产科学研究所挑选 1 年以上、性成熟、体形良好的雌雄草鱼作为亲鱼, 采用人工湿法受精获得受精卵, 发育温度控制在 20~30℃。分别在囊胚期、原肠期、神经期、器官形成期、出膜前期、出膜期(0 d)、出膜 1 天(1 d)、2 d、3 d、4 d、7 d、14 d、24 d、34 d 共 14 个时期取样。

参照金鱼管家基因 β -actin(AB039726)设计荧光定量内参基因引物 Actin; 并从已得的草鱼 *PepT1* 核苷酸序列设计 *PepT1* 荧光定量引物 Nei。参考熊刚等^[14]方法, 计算出样品中基因 *PepT1* mRNA 相对表达丰度, 取其对数作图。

1.2.6 不同组织的表达差异性分析 购买的成鱼

饲喂一段时间后, 随机抓捕 3 尾取材, 分别取前肠、中肠、后肠、肝、肾、脾、心脏和肌肉等 8 个组织。提取总 RNA 并反转录成 cDNA 后, 进行荧光定量检测时所用的反应条件及数据处理同上。

1.2.7 昼夜节律的表达差异性分析 每天 09:00 和 18:00 给草鱼投食, 饲喂 10 d 使其适应后, 分别在 03:00、06:00、09:00、12:00、15:00、18:00、21:00、24:00 取材。取材时快速将草鱼固定在冰上, 用已灭菌的剪刀和镊子将肠道取出, 挤出肠道内的食糜, 用冰浴的 PBS 缓冲液清洗, 剥离掉肠道上附着的肠结缔组织。将肠道分为前、中、后 3 份, 并分别用剪刀剪碎, 快速分成小份置于液氮保存, 用于后续实验的总 RNA 提取。进行荧光定量检测时所用的反应条件及数据处理同上。

2 结果与分析

2.1 草鱼肠道 *PepT1* 基因的克隆

分段克隆草鱼肠道 *PepT1* 基因, 并验证为阳性后, 经 DNAMAN 软件分析, 去掉重叠区后拼接得到 *PepT1* cDNA 全长序列(图 1 为部分序列), 其大小为 2 762 bp。基因序列提交基因库, 登录号: JN088166。

2.2 *PepT1* cDNA 全长序列分析

2.2.1 *PepT1* cDNA 全长序列基本特征 使用

CLC Main workbench 软件分析草鱼 *PepT1* cDNA 序列, 预测开放阅读框与 NCBI 网上分析一致, 包括 5'非编码区(Untranslated region, UTR)141 bp、3'UTR 479 bp 且含 33 bp 的 poly(A)尾, 开放阅读框(Open reading frame, ORF)2 142 bp, 含 1 个 ATG 启动子和 1 个 TAG 终止子, 共编码 713 个氨基酸(图 1); 预测蛋白质的分子量和等电点与 DNAMAN 软件预测一致, 分别为 79.29 kD 和 5.87。

2.2.2 *PepT1* 基因的同源性及进化分析 在 GenBank 中进行 Blast 分析, 获取到 12 个物种 *PepT1* 基因序列(表 2)。使用 DNAMAN 软件的 Homology&Distance Matrices 模式进行 13 条基因核苷酸以及预测氨基酸序列同源性分析。结果显示, 与其他脊椎动物相比, 草鱼肠道 *PepT1* 基因的核苷酸序列的同源性为 53.9%~77.6%, 氨基酸序列的同源性为 57.0%~78.0%。根据脊椎动物的 *PepT1* 氨基酸序列构建进化树显示: 鱼纲中草鱼和鲫、斑马鱼独立形成一支; 爬行纲中的巨蜥独立形成一支; 但在哺乳纲中除兔子单独分支外, 其他哺乳动物形成一大支(图 2)。系统发育树显示的亲缘关系与传统分类学基本一致。

2.2.3 *PepT1* 核苷酸及蛋白预测结构特征 LCL Main workbench 6.0 和 RNA structure 4.5 对 *PepT1* mRNA 二级结构进行综合分析显示, 5'端和 3'端存

表 1 *PepT1* 和 β -actin 引物参数
Tab. 1 Parameters of primer pairs for *PepT1* and β -actin gene

引物名称 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')
P+	5'-TCCATTAACGCTGGCAGT-3'
P-	5'-GAGAAGTCAGGCCGGT-3'
GSP ₁ ⁺	5'-TGCAGCTGGCTTG-3'
GSP ₂ ⁻	5'-AACATTGGCAGAGGGATA-3'
NGSP ₁ ⁺	5'-CACATGGCCTGGCAGAT-3'
NGSP ₂ ⁻	5'-AAAGCCAGGGAAACAG-3'
3'RACE Olig(T)-Adaptor	5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCCTTTTTTTTTTT-3'
3'RACE Adaptor	5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3'
5'RACE Olig(T)-Adaptor	5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTT-3'
5'RACE Adaptor	5'-GACTCGAGTCGACATCG-3'
Nei+	5'-TGCTCTTGTGTTCATCG-3'
Nei-	5'-CTCTCTTGGGTATTGCTT-3'
Actin+	5'-GAACACTGTGCTGTGGAGGTA-3'
Actin-	5'-CTTGGGTTGGTCGTTGAATC-3'

图 1 草鱼 *PepT1* cDNA 及预测的氨基酸的部分序列

Fig. 1 *PepT1* cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *Ctenopharyngodon idellus*

在大量的茎-环结构，编码区只有少量茎-环结构。用 Anthe_2000 和 TMHMM Server 2.0 软件对编码氨基酸跨膜结构进行分析发现：草鱼 PepT1 具有 11 个螺旋跨膜结构(图 3)，从 N 端的第 35 个氨基酸残基开始，至第 672 个氨基酸残基完成跨膜，其 N 端位于细胞内，C 端位于细胞外；TMpred Server 在线分析草鱼 PepT1 蛋白序列，结果表明与 Anthe_2000 软件分析结果相似。鲫等 12 个物种分析都存在 11~13 个跨膜区，如鼠、家鼠、巨蜥、兔和马都有 11 个跨膜区，鲫与牛、狗、猴、黑猩猩、人有 12 个跨膜区，而斑马鱼有 13 个跨膜区。草鱼 PepT1 蛋白结构与哺乳类动物 PepT1 蛋白结构十分相似。通过 PREDICT PROTEIN 软件分析显示，草鱼 PepT1 氨基酸序列存在 9 个 N-糖基化位点，1 个 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点，5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点。其中分布在胞外大环上的有 7 个 N-糖基化位点、3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点，而其余的位点分布在膜内环上。

2.3 *PepT1* mRNA 表达特征

2.3.1 草鱼发育过程中 *PepT1* 表达特征 在发育过程中, 不同发育阶段的表达量相差较大(图 4), *PepT1* mRNA 从囊胚期到原肠期表达量增加, 并在原肠期达到最大值, 随后降低, 从器官形成期到出膜第 1 天, 表达量逐渐增加, 在出膜第 2 天再次出现转折后, 表达量逐渐升高, 出膜第 7 天后,

表达量达到最大值，随后表达量趋于稳定。

2.3.2 草鱼不同组织 *PepT1* 表达特征 *PepT1* 在草鱼前肠、中肠、后肠、肝、肾、脾、心和肌肉等组织中均有表达，但在前肠组织表达最高，其相对表达量是中肠和后肠表达量的 14 倍和 23 倍；肌肉、肾、心和肝表达量依次减少，后肠表达量最低，并且每个组织的表达量之间都存在显著性差异($P<0.05$)(图 5)。

表 2 草鱼与其他动物 *PepT1* 核苷酸及预测氨基酸序列相似性

Tab. 2 The similarity dataset of *PepT1* nucleotide and amino acid sequences between *C. idellus* and other species

物种 species	核苷酸同源性/% nucleotide identity	氨基酸同源性/% amino acid identity
草鱼 <i>C. idellus</i>	100	100
鲫 <i>C. auratus</i>	77.6	78.0
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	74.0	76.7
鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	55.1	58.0
家鼠 <i>Mus musculus</i>	54.8	57.5
巨蜥 <i>Xenopus tropicalis</i>	55.9	61.8
牛 <i>Bos taurus</i>	54.4	58.0
兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	54.0	57.3
狗 <i>Canis lupus familiaris</i>	54.2	58.9
马 <i>Equus caballus</i>	59.1	59.2
猴 <i>Macaca mulatta</i>	54.1	57.9
黑猩猩 <i>Pongo abelii</i>	54.0	57.3
人 <i>Homo sapiens</i>	53.9	57.2

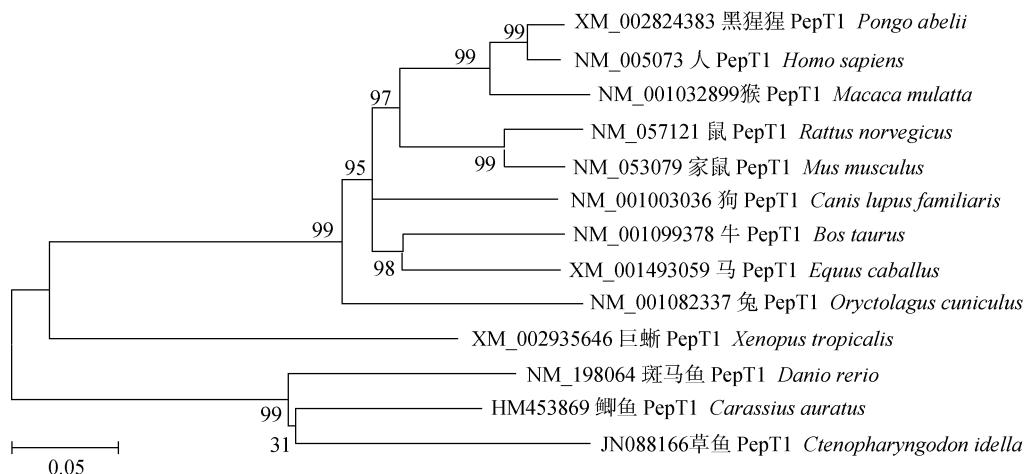


图 2 PepT1 系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of the PepT1

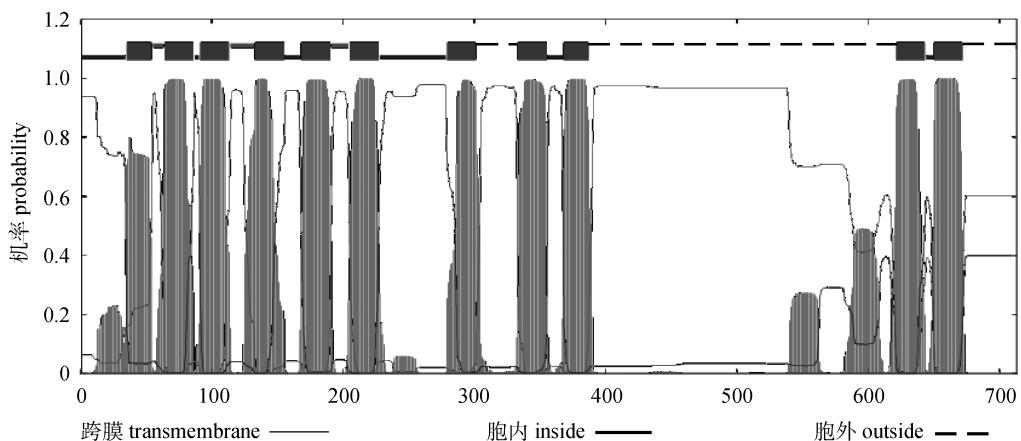


图 3 草鱼肠道基因 PepT1 二级结构模型

Fig. 3 Secondary structure model of PepT1 of *C. idellus*

Note: 11 transmembrane domains of PepT1 Predicted by TMHMM Server v. 2.0. The C-terminal of PepT1 was out of the cytoplasm and the N-terminal was in the cytoplasm.

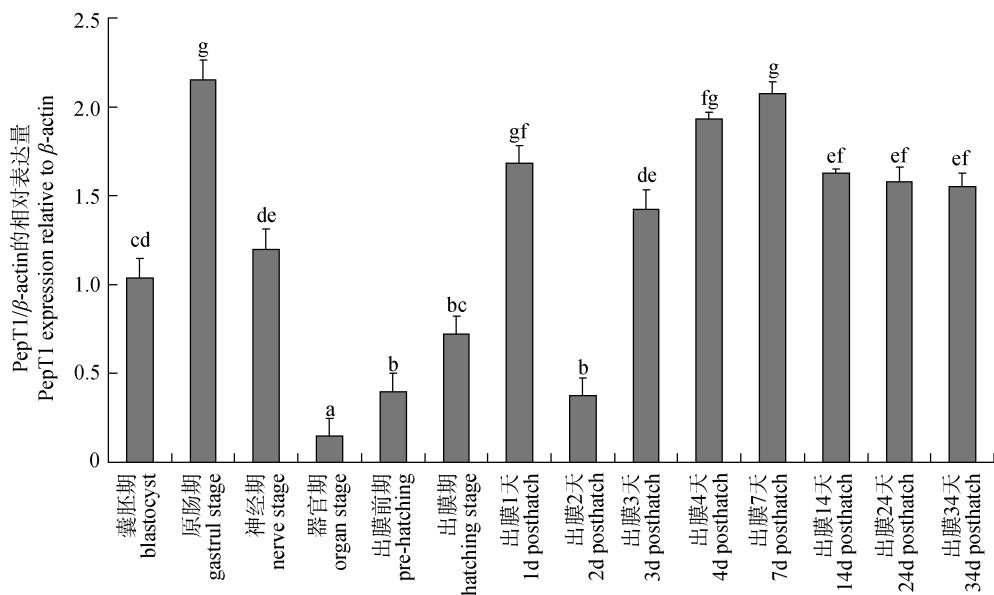
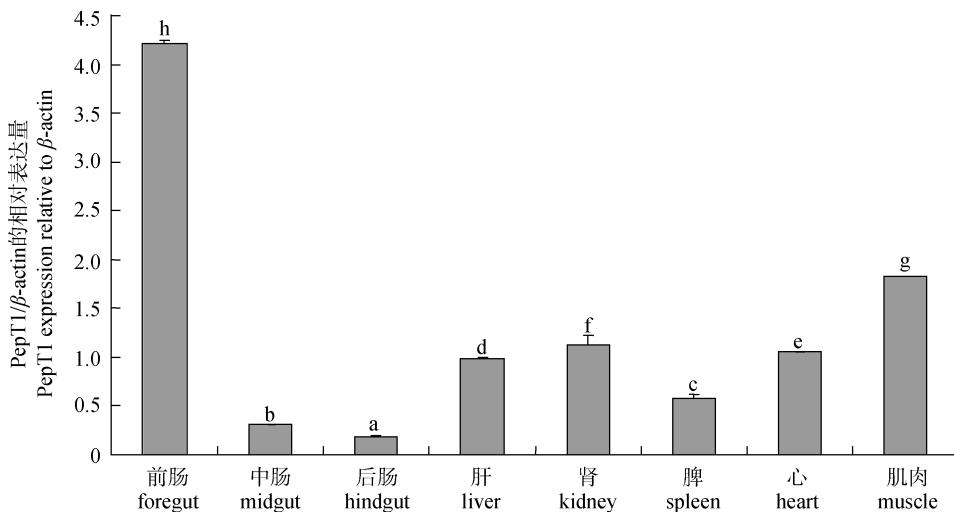
2.3.3 昼夜节律中 *PepT1* 表达特征 草鱼 *PepT1*

在夜间的表达量比白天高，特别是前肠和后肠表现更为显著，前肠的表达变化不大；前肠的表达量在 09:00 和 18:00 两次投食之间呈逐渐降低的趋势，而在其他时间表达量都比较高，且差异不显著；中肠在当天投食之前表达量很高，且差异性不显著，其余的时间表达量变化较大，但是在两次投食之后，表达量都有一个短暂的上升期；后肠中 03:00 的表达量最大，投食的两个时间点其次，其他时间段表达量很少。并且在每一个取样时间点，前肠的表达量始终是最大，中肠次之，后肠最低(图 6)。

3 讨论

3.1 草鱼肠道 *PepT1* 的结构

小肽转运是动物组织内依赖小肽转运载体的一个重要生理过程，底物的吸收是逆浓度进行的。目前，小肽转运载体基因在人^[10]、畜禽^[5]、斑马鱼^[15]等多种物种中已被克隆。本研究以草鱼为材料，成功克隆小肽转运载体基因 cDNA 全序列。通过核苷酸和氨基酸序列多重比对发现，草鱼 *PepT1* cDNA 核苷酸和氨基酸残基与低等脊椎动物鲫鱼和斑马鱼具有很高同源性，而与其他 10 种高等脊椎动物相比较，同源性偏低。通过系统进化树发现，草鱼小肽转运载体 *PepT1* 位于鱼纲

图 4 发育阶段 *PepT1* mRNA 的相对表达丰度不同字母表示差异显著($P<0.05$)。Fig. 4 The relative abundance of *PepT1* mRNA at different Developmental stages
Different letters indicate statistical difference ($P<0.05$).图 5 *PepT1* mRNA 的各组织相对表达丰度图中数据表示为平均值±标准差($n=3$)，不同字母表示差异显著($P<0.05$)。Fig. 5 The relative abundance of *PepT1* mRNA in different tissues
Error bars indicate the mean and standard deviation ($n=3$). Different letters indicate statistical difference ($P<0.05$).

动物一支，与鲫和斑马鱼的亲缘关系最近，这与系统分类学方法得到的结果基本一致。

通过生物软件 Anthe_2000 和 TMHMM Server 2.0 对草鱼小肽转运载体氨基酸序列结构预测分析显示，该蛋白具有与其他物种十分相似的 11 个螺旋跨膜结构，但与其他动物有些差别，主要特征依然十分保守，如蛋白序列的 N-端在细胞质内，

在第 9 个和第 10 个跨膜区之间有一个大的胞外环等。草鱼小肽转运载体氨基酸序列中，His-64 和 His-111 分别位于预测的第 2 个和第 3 个跨膜区，估计和人 PepT1 (hPepT1)^[16] 具有相同的功能。基因和蛋白质是生物统一性的重要标志^[17]，而糖链则是生物多样性最重要的标志分子^[18]，可影响蛋白质三维空间结构或决定蛋白质在细胞内的转送

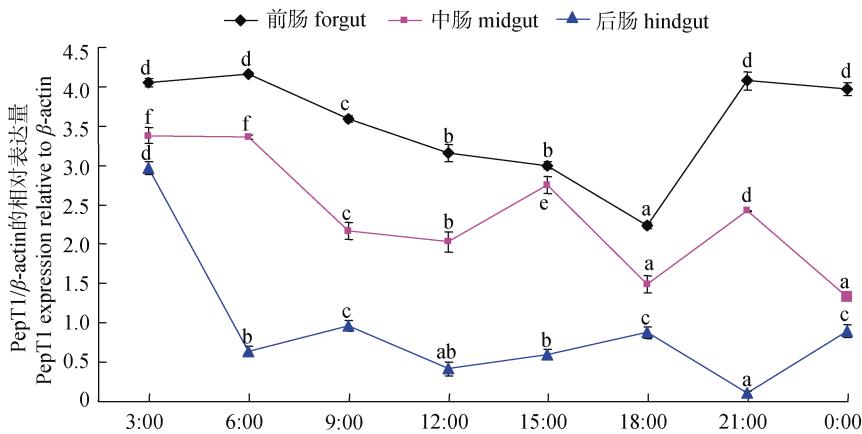


图 6 昼夜节律 *PepT1* mRNA 的相对表达丰度

图中数据表示为平均值±标准差($n=3$)，不同字母表示差异显著($P<0.05$)；数据的差异性只进行了相同组织的纵向分析。

Fig. 6 The circadian rhythm of the relative abundance of *PepT1* mRNA

Error bars indicate the mean and standard deviation ($n=3$). Different letters indicate statistical difference ($P<0.05$); the difference of these data is only analyzed through the vertical level of the same organization.

方向等^[19]，故有其重要的生物学意义。通过糖基化位点分析显示，草鱼小肽转运载体氨基酸序列与其他 12 个物种糖基化分布位点相似，在大的胞外环上，与斑马鱼^[20]相似，存在 7 个膜外 N-糖基化位点，并且同一类物种之间的分布规律相似度更高，这暗示了不同物种之间，小肽转运载体氨基酸残基糖基化位点保留了较高同源性的生物特征。通过 PREDICT PROTEIN 软件分析显示，草鱼 *PepT1* 蛋白激酶磷酸化位点和蛋白激酶 C 磷酸化位点与斑马鱼具有较高的保守性^[21]，蛋白激酶 C 能调控 Caco-2 细胞 *PepT1* 基因的表达^[21]，草鱼 *PepT1* 活性是否受到蛋白激酶 C 的调控，磷酸化位点与其生理作用的关系等科学问题有待进一步的研究验证。

3.2 草鱼 *PepT1* 基因的表达分析

PepT1 不仅在不同种属动物体内分布不一致，而且在同一个体内不同器官的分布亦不一致，*PepT1* mRNA 主要在小肠和肾上皮细胞中表达^[22]，特别是肠道的前段表达量很高，在结肠、胆管上皮细胞、脑细胞、肝和肾中表达较少^[23-25]，并且在肠道中，沿肠管垂直方向，*PepT1* 的表达由绒毛顶部向隐窝部位逐渐下降；沿肠管纵轴方向，由十二指肠至回肠 *PepT1* 分布密度逐渐降低等两种分布模式^[26-27]，这种分布差异反映了蛋白质消化吸收部位和对小肽利用程度的差异。本研究发现

小肽转运载体 *PepT1* 基因在草鱼前肠、中肠、后肠、肝、肾、脾、肌肉和心等多种组织中均有表达，特别是本研究发现 *PepT1* 基因在草鱼前肠表达最高、中肠其次、后肠最低，这可推断 *PepT1* 在草鱼肠道组织的表达也是沿肠管纵轴方向表达量逐渐降低，这与其他的动物，如成体鸡^[12]、虹鳟(*O. mykiss*)^[28]、泥鳅(*Oriental weatherfish*)^[29]、欧洲黑鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[30]等的研究结果类似，发现草鱼肠道小肽转运载体基因的表达特征，在一定程度上有助于分析饲料蛋白在体内消化和吸收的规律。

草鱼在胚胎发育阶段，是采用内源式的营养方式，不断摄食卵黄囊蛋白。草鱼孵化出膜之后，逐渐采用外源式的营养方式，不断摄食环境中的营养物质。已有的研究表明蛋白在体内最终降解产物主要以小肽的形式，通过肠道小肽转运载体 *PepT1* 将之从细胞外转运到细胞内，研究胚胎发育和早期发育阶段草鱼 *PepT1* mRNA 的表达变化，将有助于了解小肽吸收的分子机理。本研究利用实时定量 PCR 技术检测 *PepT1* 在草鱼胚胎发育和早期发育阶段的表达变化发现，胚胎发育过程中，除原肠期外，草鱼胚胎的 *PepT1* mRNA 表达量较低，这是否由于在胚胎期，受精卵中的卵黄囊含有大量的蛋白所致^[31-32]，还有待进一步研究；草鱼出膜后，小肽转运载体的表达量增加以满足机

体对外源蛋白的消化吸收利用需要, 随后有所降低但趋于稳定, 这可能与草鱼的消化道发育有关^[33], 因为草鱼从出膜后第3天起, 消化道各部分开始分化, 而且出现了许多雏形结构, 在出膜后第7~9天草鱼已具完善的摄食能力。整体水平上, *PepT1* mRNA 的表达量随着发育而逐渐增加, 与大西洋鳕^[34]和鸡^[35]等的发育过程研究结果相似。

生物体的各种生理机能适应外界环境的昼夜变化而建立起的规律周期被称为昼夜节律。小肠内的消化酶、转运营养物质的载体基因和蛋白的节律性表达已在哺乳动物和家禽中有了大量的研究, 这些节律性对动物的肠道功能及疾病控制密切相关^[36~38], 在实际生产中, 对调整养殖动物饲料组成与饲养模式, 提高养殖效益具有重要指导价值^[39~41]。本研究发现 *PepT1* 基因在草鱼肠道的前、中、后部位均呈现出昼夜节律的变化规律, 这为草鱼饲养的投食和摄食研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Webb K E. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: A Review [J]. J Anim Sci, 1990, 68: 3011~3022.
- [2] Agar W T, Hird F J, Sidhu G S. The active absorption of amino-acids by the intestine [J]. J Physiol, 1953, 121(2): 255~263.
- [3] Fei Y J, Kanai Y, Nussberger S, et al. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter [J]. Nature, 1994, 368(6471): 563~566.
- [4] Pan Y X, Wong E A, Bloomquist J R, et al. Poly (A) + RNA from sheep omasal epithelium induces expression of a peptide transport protein(s) in *Xenopus laevis* oocytes [J]. J Anim Sci, 1997, 75(12): 3323~3330.
- [5] Chen H, Wong E A, Webb K E. Tissue distribution of a peptide transporter mRNA in sheep, dairy cows, pigs and chickens [J]. J Anim Sci, 1999, 77: 1277~1283.
- [6] Wenzel U, Kuntz S, Daniel H. Flavonoids with Epidermal Growth Factor-Receptor Tyrosine Kinase Inhibitory Activity Stimulate PEPT1-Mediated Cefixime Uptake into Human Intestinal Epithelial Cells [J]. Biotransporters, 2001, 299(1): 351~357.
- [7] Chen H, Pan Y X, Wong E A, et al. Dietary Protein Level and Stage of Development Affect Expression of an Intestinal Peptide Transporter (cPepT1) in Chickens [J]. J Nutr, 2005, 135(2): 193~198.
- [8] Gilbert E R, Li H, Emmerson D A, et al. Developmental Regulation of Nutrient Transporter and Enzyme mRNA Abundance in the Small Intestine of Broilers [J]. Poult Sci, 2007, 86(8): 1739~1753.
- [9] Fei Y J, Kanai Y, Nussberger S. Expression cloning of a mammalian proton coupled oligopeptide transporter [J]. Nature (Lond), 1994, 368(6471): 563~566.
- [10] Liang R, Fei Y J, Prasad P D, et al. Human intestinal H⁺/peptide cotransporter: Cloning functional expression, and chromosomal localization [J]. J Biol Chem, 1995, 270(12): 6456~6463.
- [11] 叶万里, 李英文. 鱼类肠道小肽转运载体 *PepT1* 的研究进展 [J]. 河北渔业, 2009, (12): 50~54.
- [12] Gilbert-ER. Dietary and developmental regulation of nutrient transporter gene expression in the small intestine of two lines of broilers [J]. Animal Poult Sci, 2008: 1~254.
- [13] 熊刚. 鲫鱼 LAT2 和 PEPT1 基因克隆、序列分析及组织表达研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2009: 1~77.
- [14] 熊刚, 刘臻, 王晓清, 等. 鲫鱼(*Carassius auratus*)slc7A8 基因分子特征及表达分析[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(6): 935~940.
- [15] Verri T, Kottra G, Romano A, et al. Molecular and functional characterisation of the zebrafish (*Danio rerio*) PepT1-type peptide transporter [J]. FEBS letters, 2003, 549(1~3): 115~122.
- [16] Fei Y J, Liu W, Prasad P D. Identification of the histidyl residue obligatory for the catalytic activity of the human H⁺/peptide co-transporters PepT1 and PepT2 [J]. Biochemistry, 1997, 36(2): 452~460.
- [17] 刘振兴, 柯浩, 曹艳林, 等. 日本鳗鲡谷胱甘肽过氧化物酶 1 和 4 的克隆、分析和组织表达分布[J]. 中国水产科学, 2010, 17(3): 439~447.
- [18] 明建华, 谢骏, 刘波, 等. 团头鲂 HSP70 cDNA 的克隆、序列分析以及热应激对其 mRNA 表达的影响[J]. 中国水产科学, 2009, 15(6): 635~648.
- [19] 刘丽燕, 杨爱国, 王清印, 等. 长牡蛎精子膜蛋白的提取及其部分生化活性的研究[J]. 中国水产科学, 2007: 14(6): 889~895.
- [20] Verri T, Kottra G, Romano A, et al. Molecular and functional characterisation of the zebrafish (*Danio rerio*) PepT1-type peptide transporter [J]. FEBS Letters, 2003, 549(1~3): 114~122.
- [21] Brandsch M, Miyamoto Y, Ganapathy V, et al. Expression and protein kinase C-dependent regulation of peptide/H⁺

- co-transport system in the Caco-2 *human* colon carcinoma cell line [J]. *Biochem J*, 1994, 299(1): 253–260.
- [22] Daniel H, Kpttra G. The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology [J]. *Pflugers Archiv: Eur J Physiol*, 2004, 447(5): 610–618.
- [23] Ford D, Howard A, Hirst B H. Expression of the peptide transporter hPepT1 in *human* colon: a potential route for colonic protein nitrogen and drug absorption [J]. *Histochem Cell Biol*, 2003, 119(1): 37–43.
- [24] Knutte I, Rubio A I, Boll M, et al. H^+ -peptide cotransport in the human bile duct epithelium cell line SKChA-1 [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 283(1): 222–229.
- [25] Miyamoto K, Shiraga T, Morita K, et al. Sequence, tissue distribution and developmental changes in rat intestinal oligopeptide transporter [J]. *Bioch Biophys Acta*, 1996, 1305 (1–2): 34–38.
- [26] Ogijara H, Suzuki-T, Nagamachi Y, et al. Peptide transporter in the *rat* small intestine: ultrastructural localization and the effect of starvation and administration of amino acids [J]. *Histochem J*, 1999, 31(3): 169–174.
- [27] Tanaka H, Miyamoto K I, Morita K, et al. Regulation of the PepT1 peptide transporter in the *rat* small intestine in response to 5-fluorouracil-induced injury [J]. *Gastroenterology*, 1998, 14(4): 714–723.
- [28] Ostaszewska T, Kamaszewski M, Grochowski P, et al. The effect of peptide absorption on PepT1 gene expression and digestive system hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Compar Biochem Physiol. Part A, Molec Integr Physiol*, 2010, 155(1): 107–114.
- [29] Goncalves A, Cstro L, Pereira W C, et al. Is there a compromise between nutrient uptake and gas exchange in the gut of *Misgurnus anguillicaudatus*, an intestinal air-breathing fish? [J]. *Compar Biochem Physiol. Part D, Genom Proteom*, 2007, 2(4): 345–355.
- [30] Terova G, Cord S, Verri T, et al. Impact of feed availability on PepT1 mRNA expression levels in sea bass (*Dicen- trarchus labrax*) [J]. *Aquaculture*, 2009, 294(3–4): 288–299.
- [31] Noy Y, Sklan N D. Yolk and exogenous feed utilization in the posthatch chick [J]. *Poult Sci*, 2001, 80(10): 1490–1495.
- [32] Noy Y, Uni Z, Sklan D. Routes of yolk utilisation in the newly-hatched Chick [J]. *Brit Poult Sci*, 1996, 37(5): 987–995.
- [33] 龚启祥, 杨文鸽. 草鱼消化道发育的组织学观察[J]. 浙江水产学院学报, 1990, 9(2): 85–94.
- [34] Amaerg J J, Myr C, Kamisaka Y, et al. Expression of the oligopeptide transporter, PepT1, in larval Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. *Compar Biochem Physiol. Part B, Biochem Molec Biol*, 2008, 150(2): 177–182.
- [35] Gilbert E R, Li H, Emmerson D A. Developmental regulation of nutrient transporter and enzyme mRNA abundance in the small intestine of *Broilers* [J]. *Immunol Molec Biol*, 2007, 13(8): 1739–1753.
- [36] Dunlap J C. Molecular bases for circadian clocks [J]. *Cell*, 1999, 96(2): 271–290.
- [37] Steamd A T, Balakrishnan A, Rhoads D B, et al. Diurnal rhythmicity in the transcription of jejunal drug transporters [J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 108(1): 144–148.
- [38] Pan X, Terada T, Irie M, et al. Diurnal rhythm of H^+ -peptide cotransporter in rat small intestine [J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2002, 283(1): 57–64.
- [39] Houghton S G, Duenes J A, Fatima J, et al. Coordinated, diurnal hexose transporter expression in rat small bowel: Implications for small bowel resection [J]. *Surgery*, 2008, 143(1): 79–93.
- [40] Pan X, Terada T, Okuda M, et al. The diurnal rhythm of the intestinal transporters SGLT1 and PEPT1 is regulated by the feeding conditions in rats [J]. *J Nutr*, 2004, 134(9): 2211–2215.
- [41] Fatlma J, Iqbal C W, Houghton S G, et al. Hexose transporter expression and function in *mouse* small intestine: Role of diurnal rhythm [J]. *J Gastroint Surg*, 2009, 13(4): 634–641.

Cloning of the *PepT1* gene and analysis of its expression in *Ctenopharyngodon idellus* tissues

FENG Junchang^{1,3}, LIU Zhen^{1,2}, LU Shuangqing^{1,2}, NIE Guoxing³, ZHOU Ling^{1,2}, SUN Lang^{1,2}

1. Biotechnology and Nutrition Research Institute, Changsha University, Changsha 410003, China;

2. Department of Biotechnology and Environmental Science, Changsha University, Changsha 410003, China;

3. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Abstract: To study the molecular mechanism of the small peptide transporter PepT1-mediated protein digestion and absorption, a full-length cDNA sequence of the *PepT1* gene was cloned from *Ctenopharyngodon idellus* using RT-PCR and RACE techniques. The full-length cDNA sequence of *PepT1* had 2762 nucleotides, including 141 nucleotides at 5'UTR and 479 nucleotides at 3'UTR. Its open reading frame had 2142 nucleotides encoding a 713-amino-acid peptide. The *PepT1* gene sequences from *C. idellus* were most similar to those of *Carassius auratus* and *Danio rerio* at 77.6% and 74.0%, respectively; the deduced amino acid similarities were 78.0% and 76.7%, respectively; but the *PepT1* gene sequence varied in similarity to other animals from 53.9% to 59.1%, and the deduced amino acid similarities were 60.5%—61.6%. The encoded protein molecular weight was predicted at 79.29 kD with pI at 5.87. The PepT1 protein had 11 helix trans-membrane regions; its amino acid sequence was highly homologous to those of other vertebrates. Phylogenetic analysis showed that the *PepT1* gene sequence clustered with *C. auratus* and *D. rerio* as its closest neighbor. The abundances of *PepT1* mRNA assayed by real-time PCR were differentially expressed by tissue type; the highest expression was in the foregut tissue and the second was in the muscle. However, *PepT1* mRNA expression was relatively stable after incubation for 7 days. The *PepT1* gene expressed rhythmically in the small intestine of *C. idellus*. Its expression was higher during the night and lower during the day. This work provides a theoretical basis for the molecular mechanism of protein digestion and absorption by the small peptide transporter PepT1, which mediates intestinal transport of small peptides *in vivo*.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; *PepT1* cDNA; molecular characteristics; mRNA expression profile

Corresponding author: LIU Zhen. E-mail: 25300085@qq.com