

# 南方鲇 GK 基因片段的克隆及序列分析\*

李佳蔚, 李英文

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 400047)

**摘要:** 为从南方鲇(*Silurus meridionalis*)中扩增葡萄糖激酶(GK)基因,根据已报道的GK基因结构中的氨基酸保守区域,设计简并引物;从南方鲇肝脏中迅速抽提RNA,将扩增出的产物克隆到pMD18-T载体上并导入到大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中,阳性克隆鉴定后测序。将测序得到的南方鲇GK基因与已知的GK基因进行核苷酸序列比较,结果表明其与鲤(*Cyprinus carpio*)的同源性较高,达到83%;将此基因片段与其他已知的GK基因做出进化关系的确定,用Phylip软件NJ bootstrap方法构建GK系统树,它与草鱼(*Ctenopahryngodon idellus*)、鲤、鲫(*Carassius auratus*)、翘嘴红鲇(*Eruthroculter ilishaeformis*)、虹鳊(*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、金头鲷(*Sparus aurata*)、黄易鲷(*Rhabdosargus sarba*)等以较高的支持度形成一个分支。本研究成功地从南方鲇肝脏中扩增到长度为688 bp的编码蛋白酶的基因片段,为今后克隆南方鲇GK基因全长序列及该基因在不同营养条件下的表达等研究奠定基础。

**关键词:** 南方鲇;葡萄糖激酶;基因克隆;序列分析

中图分类号: Q785

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2011)05-0025-04

葡萄糖激酶(GK)是己糖激酶家族成员,在控制葡萄糖利用率保持葡萄糖平衡方面起着十分重要的作用<sup>[1-7]</sup>,是糖代谢过程中的第一个关键酶。但是,鱼类对糖的利用率却较低,目前对此比较公认的解释是由于鱼类肝脏缺乏可诱导GK活力而不能有效地使细胞内的葡萄糖转化为6-磷酸葡萄糖,但这一解释和现有的有关鱼类存在有功能的GK样酶活力以及饲料中碳水化合物对GK表达的诱导作用明显有着矛盾<sup>[8-9]</sup>。本研究报道了从南方鲇(*Silurus meridionalis*)肝脏中分离到的GK cDNA序列片段,并对其序列进行了比较和分析,为今后克隆南方鲇GK基因全长序列及该基因在不同营养条件下的表达等研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与主要试剂

实验用南方鲇购于重庆市沙坪坝区三峡广场永辉超市。抽提RNA用RNAiso Plus,购自宝生物工程(大连)有限公司;大肠杆菌(*E. coli*)DH5 $\alpha$ 为本实验室保存;反转录酶、Taq酶和pMD18-T Vector均

购自TaKaRa;DNA胶回收试剂盒、DNA Maker D1500购自天根生化科技(北京)有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 PCR引物设计 实验中引物的碱基位置根据登录GenBank序列(GenBank accession No. DQ195521)确定。根据已知鱼类GK的保守片段,再根据文献[10],用BLAST程序将其与蛋白质序列数据库中的序列进行比较,寻找出几种同源性较高的片段,参考几种鱼类葡萄糖激酶的核苷酸序列,设计PCR反应的简并引物P1、P2分别为CGGGTGATGCTGGTGAARGTGGGNGA和GCACCAGCTCGCCC-ATRTRACTNCC。其中,R=A+G,N=A+C+T+G。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2.2 总RNA的抽提及cDNA第一链合成<sup>[11-12]</sup>

取南方鲇肝脏,用RNAiso Plus抽提总RNA。采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,并通过OD260/280比值判断RNA质量。以南方鲇肝脏RNA为模板,以Oligo(dT)为引物,由First Strand cDNA Synthesis Kit反转

\* 收稿日期 2011-06-01 修回日期 2011-06-28 网络出版时间 2011-09-17 13:59:00

资助项目:重庆市自然科学基金(No. CSTC2007BB1229)

作者简介:李佳蔚,女,硕士研究生,研究方向为动物营养学;通讯作者:李英文,E-mail:liyiw@live.cn

网络出版地址: [http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20110917.1359.201105.25\\_005.html](http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20110917.1359.201105.25_005.html)

录合成 cDNA 第一链,参照试剂盒说明书,体系设置为  $5 \times$  PrimeScript™ RT reagent Kit  $4.0 \mu\text{L}$ , PrimeScript™ RT Enzyme Mix  $1.0 \mu\text{L}$ , Oligo dT Primer ( $50 \mu\text{mol/L}$ )  $1.0 \mu\text{L}$ , Random 6mers ( $100 \mu\text{mol/L}$ )  $1.0 \mu\text{L}$ , RNA  $0.15 \mu\text{L}$ , Rnase Free  $\text{dH}_2\text{O}$   $12.85 \mu\text{L}$ 。反转录条件如下  $37^\circ\text{C}$ ,  $15 \text{ min}$ ;  $85^\circ\text{C}$ ,  $15 \text{ s}$ 。

1.2.3 RT-PCR 扩增及克隆测序 以 cDNA 为模板,采用合成的一对引物,进行 PCR 反应。PCR 反应体系(总体积为  $50 \mu\text{L}$ )为:  $\text{dH}_2\text{O}$   $32.5 \mu\text{L}$ ,  $10 \times$  PCR buffer(含  $\text{Mg}^{2+}$ )  $5.0 \mu\text{L}$ , 模板(cDNA 液)  $2.0 \mu\text{L}$ , dNTP Mixture( $10 \text{ mmol/L}$ )  $4.0 \mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $4.0 \mu\text{L}$ , 上下游引物( $20 \text{ mmol/L}$ )各  $1.0 \mu\text{L}$ , Taq 酶( $5 \text{ U}/\mu\text{L}$ )  $0.5 \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为:  $94^\circ\text{C}$  变性  $3 \text{ min}$ , 然后  $30$  个循环  $94^\circ\text{C}$  变性  $1 \text{ min}$ ,  $60^\circ\text{C}$  退火  $1 \text{ min}$ ,  $72^\circ\text{C}$  延伸  $1 \text{ min}$ , 最后  $72^\circ\text{C}$  延伸  $10 \text{ min}$ ,  $4^\circ\text{C}$  保存。PCR 产物在  $1.2\%$  的琼脂糖凝胶上电泳分析并观察结果及割胶回收。利用 DNA 回收试剂盒回收目的片段。

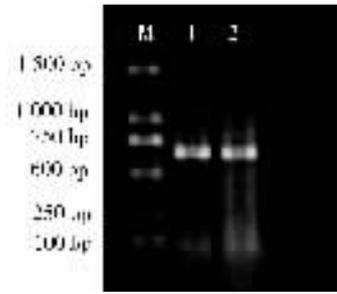
用  $4 \mu\text{L}$  目的 DNA、 $1 \mu\text{L}$  pMD18-T 载体和  $5 \mu\text{L}$  Ligation buffer 配制连接反应液,将此混合液于  $16^\circ\text{C}$  下过夜,以使得目的 DNA 与 pMD18-T 载体连接起来。将质粒 DNA 转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞,涂布在含 X-gal + IPTG + 氨苄青霉素的 LB 平板上进行蓝白斑筛选。挑取白色菌落,经过菌落 PCR,选取阳性菌株以质粒小提试剂盒抽提质粒,然后进行质粒 PCR 鉴定、电泳鉴定并进行 DNA 测序。将所测的序列结果在 NCBI 网站上通过 Blast 进行序列相似性分析,最后用 DNAMAN6.0 软件进行序列比较分析。

## 2 结果

### 2.1 RNA 的提取及 RT-PCR

从南方鲇肝胰脏提取的总 RNA,用 Nano Drop 测定 OD $260/280$  的比值及 RNA 浓度。样品 OD $260/280$  比值为  $1.88$ ,说明所提取的 RNA 质量较好,纯度符合要求。另外用  $1.2\%$  的琼脂糖凝胶电泳检测显示  $28 \text{ s}:18 \text{ s}$  约为  $2:1$ ,因此所提取的 RNA 较完整,完全能够满足 RT-PCR 的要求。

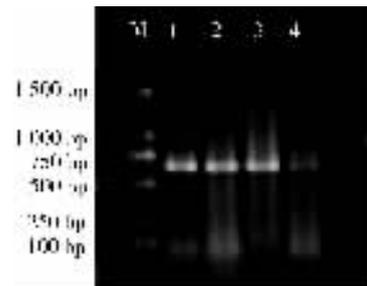
RT-PCR 产物经  $1.2\%$  的琼脂糖凝胶电泳显示在在 DNA Marker 的  $750 \text{ bp}$  和  $500 \text{ bp}$  之间有 1 条带(图 1),与引物设计时预测的片段大小一致,初步判断为目的条带。将 RT-PCR 产物回收与载体连接转化并挑取白色单个菌落进行扩大培养,PCR 经琼脂糖凝胶电泳鉴定(图 2)、序列测定。



M: DNA Marker D1500; 1~2: RT-PCR 产物

图 1 RT-PCR 产物检测电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products



M: DNA Marker D1500; 1~3: 阳性克隆; 4: 非阳性克隆

图 2 重组质粒电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid

### 2.2 序列分析

测序结果显示,克隆所得片段大小为  $688 \text{ bp}$ ,序列顺序见图 3,其中下划线部分为引物序列。根据所得 cDNA 序列推导出其蛋白质的氨基酸序列,含有  $216$  个氨基酸残基(图 4)。

```
GCACCAGCTGCCCATATACTTTCCGCTGATAAGCTTCT
CATAGAGCTGTTTCCCGGGGTGATCGATGACTCGTCCA
CCACTCGGTCTGATTCCAAACGAAAGTCTTCCAGCTCTC
CGTTCCCTCCGAAACGCTCCCCACTCTGTGTTACACACA
TCTCCTCCCTCTCTCTCTCCACCAGCTCCACAGAGTGCA
TCTCCTCCATGTAGCAGACAGTTGCAGCCCGTCCCACTA
TCATGCCAACCTCAGAGCTCCGGTCTCATAGTAACAGG
AGATCATGTAGCCACTGTGTCATTCACCATGGCAACTA
TGTCCATCTCAAAGTCCCTCTTCGTTTTATGGCATCTCT
GAGGAGACCAACAATGTTGTTGCCCTTCTGCACCAGAGG
CCTTGAACCCCTTTACTCCACTTCACTAGGATTCCTTGT
CCAGTTCTCATGCCGACTGCAAAACGAGAATGTCAAT
CCCAGACCAACTTTTTATGTTTATGCTGCTGCTTATCC
AGGAAGTCCGATATGCACCTGTCAATGTAGTCCGAATAG
ATTTCCGACTCCCGGTATGGCATCCCTCTGGAATGGAG
TACATGCAGTGTGTTGGTCTCCACCTTCCAGCTCTCTCT
TCGTCTCACCCACTTTCACCAGCATCACCCG
```

图 3 南方鲇 GKcDNA 部分序列

Fig. 3 Partial cDNA sequences of GK in *S. meridionalis*

将克隆所得核酸片段在 NCBI 上进行 BLAST 搜索,与其高度相似的都为鱼类的 GK mRNA 序列,其中相似度最高的是鲤(*Cyprinus carpio*)的 GK 序列,

同一性达 83% ;其次依次是虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、翘嘴红鲌(*Eruthroculter ilishaeformis*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲫(*Carassius auratus*)。搜索结果证实所筛选得到的克隆片段为南方鲇的 GK 基因片段。

HQLAHILSADKLLIELFPGVDRLVHHSVVFQTKVFLQSVSPERS  
 PLCVHTHPPLLSFHLHRVHLLHVAHVAARPHYHANLTAPV  
 LIVTGDHCSHCVIHHCNYVHLKVPSSFYGISEETNNVVAFCTR  
 GLEPFSPVQDSLQVLMPPDWKRECESQRKFFMFDVLLIQEVC  
 YALCNVVEHFRSPGHGILWNGVHAVFGLHLPASLFVLTHFH  
 QHHPN

图 4 推导所得南方鲇 GK 氨基酸部分序列

Fig. 4 The Partial deduced amino acid sequence of GK in *S. meridionalis*

为了确定 GK 的进化关系,从基因库收集了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)GK(蛋白库登录号:Q42525)、人(*Homo sapiens*)肝源 GK(蛋白库登录号:Q05810)、小家鼠(*Mus musculus*)GK(蛋白库登录号:AAC42074)、金头鲷(*Sparus aurata*)GK(蛋白库登录号:AAC33585)、虹鳟 GK(蛋白库登录号:AAC33586)、鲤 GK(蛋白库登录号:AAC33587)、黄易鲷(*Rhabdosargus sarba*)GK(蛋白库登录号:ACD40312)、鲫 GK(蛋白库登录号:ADD52461)、大西洋鲑(*Salmo salar*)GK(蛋白库登录号:ACF75921)、翘嘴红鲌 GK(蛋白库登录号:ABA41457)、草鱼 GK(蛋白库登录号:ADD52460)等蛋白质序列,用 Bioedit 进行序列比对,然后用 Phylip 计算系统发育树,采用邻接法<sup>[13]</sup>,构建系统发育树(图 5),用 Bootstrap 计算的各个分支支持度。

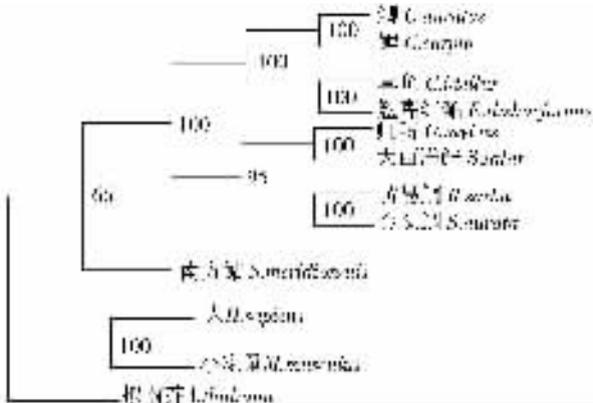


图 5 GK 系统树

Fig. 5 Phylogenetic tree of GK

### 3 讨论

对从南方鲇肝脏分离到的 GK cDNA 部分序列进行序列比对分析,结果发现该基因和上述鱼类的

GK 关系较近 和人肝脏 GK 相似性也很高。

由图 5 可见,鱼类中包括草鱼、鲫鱼、鲤鱼、翘嘴红鲌、虹鳟、大西洋鲑、金头鲷、黄易鲷与南方鲇形成一个鱼类的分支;再与小家鼠和人类以 100% 的支持度形成的一个分支合成一支。这一结果显示南方鲇 GK 与哺乳动物的 GK 为一支,因此认为该基因也是具有 GK 样酶活性的,与哺乳动物 GK 高度同源,这再一次为鱼类含有 GK 酶提供了明确的证据。

有报道指出,高碳水化合物饲料诱导了金头鲷、虹鳟、鲤鱼体内 GK 活性的增加,并进一步研究发现,饲料碳水化合物能诱导这 3 种鱼肝脏 GK 的表达,且再摄食后 6 h 时 GK 的表达量开始提高,24~30 h 时明显提高<sup>[14]</sup>。另外对青鱼、鲫鱼、南方鲇幼鱼和翘嘴红鲌<sup>[15-17]</sup>的研究中也得出了相同的结论,即碳水化合物含量的增加可诱导 GK 活性的增加以及基因的表达。但关于鱼类能否将摄入的饲料碳水化合物转化为身体脂肪尚存在争议<sup>[18-20]</sup>。

另外有报道表明,GK 活性与 mRNA 表达还与鱼类摄食碳水化合物的种类与摄食性有关,如摄食糊精饲料时 GK 活性高于摄食含相同水平葡萄糖的饲料,这可能与两种碳水化物的消化吸收速度有关,糊精的吸收模式可能更有利于诱导 GK 活性的提高<sup>[22]</sup>。另外对虹鳟的研究发现,其 GK 表达量和活性还与摄食量有关<sup>[23]</sup>。有关不同碳水化合物对南方鲇 GK 基因和酶活力的研究还有待进一步的研究。

### 参考文献:

[ 1 ] Wilson J E. Hexokinase[ J ]. Rev Physiol Biochem Pharmacol ,1995 ,126 65-198.  
 [ 2 ] Vionnet N ,Stoel M ,Takeda J ,et al. Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus[ J ]. Nature ,1992 ,356 721-722.  
 [ 3 ] Grupe A ,Hultfren B ,Ryan A ,et al. Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis[ J ]. Cell ,1995 ,83 69-78.  
 [ 4 ] Niswender K D ,Shiota M ,Postic C ,et al. Effects of increased glucokinase gene copy number on glucose homeostasis and hepatic glucose metabolism[ J ]. J Biol Chem ,1997 ,272 22570-22575.  
 [ 5 ] Matschinsky F M ,Glaser B ,Magnuson M A. Pancreatic beta-cell glucokinase :closing the gap between theoretical concepts and experimental realities[ J ]. Diabetes ,1998 ,47 ( 3 ) :307-315.  
 [ 6 ] Postic C ,Shiota M ,Niswender K D ,et al. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using cre

- recombinase[ J ]. J Biol Chem ,1999 274( 1 ) 305-315.
- [ 7 ] Piston D W ,Knobel S M ,Postic C ,et al. Adenovirus- mediated knockout of a conditional glucokinase gene in isolated pancreatic islets reveals an essential role for proximal metabolic coupling events in glucose-stimulate insulin secretion [ J ]. J Biol Chem ,1999 274( 2 ) :1000-1004.
- [ 8 ] Halver J E. Fish nutrition ,Intermediary metabolism[ M ]. New York :Academic Press ,1989 259-329.
- [ 9 ] Wilson R P. Utilisation of dietary carbohydrate by fish[ J ]. Aquaculture ,1994 ,124 67-80.
- [ 10 ] 戈贤平 ,俞菊华 ,吴婷婷. 翘嘴红鲌 GK 基因的克隆和序列分析[ J ]. 水产学报 2006 30( 3 ) #10-415.
- [ 11 ] Yang J ,Lee W H ,Zhang Y. Molecular cloning of serine protease from elapid snake venoms[ J ]. Toxicon 2007 49 ( 8 ) :1200-1207.
- [ 12 ] 樊少华 ,张子峰 ,陆军 ,等. 中华蜜蜂蜂毒蛋白酶基因 cDNA 片段的克隆及序列分析[ J ]. 江西农业大学学报 2008 ,30( 3 ) :734-738.
- [ 13 ] Saitou N ,Nei M. The neighbor-joining method :a new method for reconstructing phylogenetic trees[ J ]. Mol Biol Evol ,1987 4( 4 ) #06-425.
- [ 14 ] Panserat S ,Blin C ,Médale F ,et al. Molecular cloning tissue distribution and sequence analysis of complete glucokinase cDNAs from gilthead sea bream ( *Sparus aurata* ) , rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ) and common carp ( *Cyprinus carpio* )[ J ]. Biochim Biophysica Acta( BBA )-General Subjects 2000 ,1474 61-69.
- [ 15 ] 蔡春芳. 青鱼( *Mylopharyngodon piceus* )和鲫( *Carassius auratus* )对饲料糖的利用及其代谢机制的研究[ D ]. 上海 :华东师范大学 2004.
- [ 16 ] 林小植 ,罗毅平 ,谢小军. 饲料碳水化合物水平对南方鳊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 ) 304-311.
- [ 17 ] 刘波 ,谢峻 ,苏永腾 ,等. 高碳水化合物日粮对翘嘴红鲌生长、GK 及 GKmRNA 表达的影响[ J ]. 水生生物学报 ,2008 ,32( 1 ) #7-53.
- [ 18 ] Hemre G I ,Hansen T. Utilisation of different dietary starch sources and tolerance to glucose loading in Atlantic salmon during parr-smolt transformation [ J ]. Aquaculture ,1998 ,161 :145-157.
- [ 19 ] Kaushik S J ,Luquet P ,Blanc D ,et al. Studies on the nutrition of siberian sturgeon( *Acipenser baeri* ) I utilization of digestible carbohydrates by sturgeon [ J ]. Aquaculture ,1989 ,76 97-107.
- [ 20 ] Brange C ,Médale F ,Corraze G. Effect of dietary carbohydrate levels on growth ,body composition and glycaemia in rainbow trout , *Oncorhynchus mykiss* ,reared in seawater [ J ]. Aquaculture ,1994 ,123 :109-120.
- [ 21 ] Sanden M ,Frøyland L ,Hemre G I. Modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase ,6-phosphogluconate dehydrogenase and malic enzyme activity by glucose and alanine in Atlantic salmon , *Salmo salar* L. hepatocytes[ J ]. Aquaculture 2003 221 #69-480.
- [ 22 ] Panserat S ,Médale F ,Blin C ,et al. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout gilthead seabream and common carp[ J ]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2000 278( 5 ) :1164-1170.
- [ 23 ] Caseras A ,Metón I ,Fernandez F ,et al. Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream( *Sparus aurata* ) [ J ]. Biochim Biophysica Acta( BBA )-Gene Structure and Expression 2000 ,1493 :135-141.

## Animal Sciences

### Cloning and Sequencing Analysis of Glucosidase in *Silurus meridionalis*

LI Jia-wei , LI Ying-wen

**Abstract** : In order to clone the glucokinase gene in *Silurus meridionalis* , specific primers to glucokinase gene were designed according to the conserved regions of amino acids of glucokinase gene structure that have been reported. Encoding glucokinase cDNA fragments were amplified by RT-PCR from the total RNA in the hepatopancreas . The PCR products were ligated into pMD-18 vector , which was transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ . Positive bacteria clones were screened and identified by PCR. The sequence of glucokinase gene fragment was also determined and analyzed. Compared with *Cyprinus carpio* , the homology of the clone *S. meridionalis* glucokinase was 83% . The sequences of *S. meridionalis* and other species were used by NJ bootstrap with Phylip for the purpose of establishing the evolutionary relationship of GK. The sequence of *S. meridionalis* and *Ctenopahryngodon idellus* , *Cyprinus carpio* , *Carassius auratus* , *Eruthroculter ilishaeformis* , *Oncorhynchus mykiss* , *Salmo* , *Sparus aurata* , *Rhabdosargus sarba* forms a branch. The glucokinase gene fragment was successfully cloned whose length was 688 bp from the hepatopancreas of *S. meridionalis*. This can lay the groundwork for cloning the full-length gene. It also build a solid foundation for the study of glucokinase of *S. meridionalis* in the different nutrition.

**Key words** : *Silurus meridionalis* ; glucokinase ; gene cloning ; sequencing analysis