

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.01130

银鲫果糖-1,6-二磷酸酶的分子克隆与表达分析

王锐^{1,2,3} 肖青^{1,2} 桂建芳¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049;
3. 武汉工业学院, 动物营养与饲料科学湖北省重点实验室, 武汉 430023)

摘要: 果糖-1,6-二磷酸酶(EC 3.1.3.11)是糖异生中的关键限速酶之一, 在糖代谢中起重要作用。哺乳动物存在肝脏型和肌肉型两种果糖-1,6-二磷酸酶同工酶, 分别由 *Fbp1* 和 *Fbp2* 编码。银鲫作为我国重要的经济养殖鱼类, 尚无果糖-1,6-二磷酸酶基因的有关资料, 其组织分布特征和胚胎发育模式亦不清楚。本研究采用 RACE 方法从银鲫原肠胚 SMART cDNA 文库中扩增了果糖-1,6-二磷酸酶基因的全长 cDNA, 其长度为 1170 bp, 编码 337 个氨基酸残基, 多重序列比对和系统发育分析表明该基因为肝脏型果糖-1,6-二磷酸酶。RT-PCR 分析虽在银鲫的肝、脑、心、脾、肾、肠、肌肉和卵巢组织中皆能检测到该基因的表达, 但以肝组织的表达量最高。Western Blot 检测表明, 肝脏组织除有一条与其他组织(肌肉除外)共有的蛋白带之外, 还有一条特异带; 肌肉中有不同于其他组织的特异带。成熟卵子和不同发育阶段胚胎的 RT-PCR 和 Western Blot 分析都可检测到母源的 *CagFbp* 转录本和蛋白, 且其转录本从原肠期开始上升, 到神经胚时迅速上升到较高水平, 其蛋白从尾芽期以后出现一条比母源蛋白分子量小、与肝脏的特异带大小基本相同的蛋白带。这些结果证实本研究克隆的 *CagFbp* 为肝脏型, 且鱼类至少存在肝脏型和肌肉型两种果糖-1,6-二磷酸酶同工酶。

关键词: 银鲫; 果糖-1,6-二磷酸酶; 基因克隆; 表达模式

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)06-1130-06

果糖-1,6-二磷酸酶(EC 3.1.3.11)是糖异生中的关键限速酶之一, 它催化果糖-1,6-二磷酸水解生成果糖-6-磷酸和无机磷。该酶在细菌、真菌、植物和动物中都存在。在哺乳动物中至少存在果糖-1,6-二磷酸酶两个同工酶。一种是肝脏型的果糖-1,6-二磷酸酶, 由 *Fbp1* 编码, 其主要分布在肝脏、肾脏和肺^[1-3]; 另一种是肌肉型的果糖-1,6-二磷酸酶, 由 *Fbp2* 编码^[4]。这两种酶在酶动力学^[3,5]、免疫原性^[1,6]和氨基酸组成上均存在差异^[4,7]。通过比较人的肝脏型和肌肉型果糖-1,6-二磷酸酶的初级结构, 推测导致两种同工酶基因形成的原因可能是发生在 30 亿年前基因的复制, 通过这个粗略的估计所有的陆生动物应该具有两种不同的基因编码果糖-1,6-二磷酸酶, 而鱼类和无脊椎动物可能只具有一种基因。目前有关鱼类该基因的研究很少, Tillmann, *et al.* 仅

仅扩增了梭子鱼(*Esox lucius*)的基因片段^[9], 在斑马鱼上也只有相关序列的报道, 有关该基因在鱼类的组织表达特征和胚胎发育模式还未见报道, 因此在鱼类中是否存在两种果糖-1,6-二磷酸酶同工酶还有待于证实。

银鲫(*Carassius auratus gibelio*)经过我国科学家长期研究和育种实践, 已经培育出了“中科 3 号”第三代新品种, 由于该品种生长快、对某些病害有一定的耐受性和遗传稳定等特点, 成为鲫鱼养殖中的主要品种。此外银鲫具有雌核发育和两性生殖两种不同的生殖方式, 已被认为是研究鱼类卵子成熟、受精和早期胚胎发育的独特对象^[10,11]。近年来, 本实验室分别构建了银鲫原肠胚和成熟卵子的 SMART cDNA 文库, 并通过差异筛选的方法, 从银鲫原肠胚 SMART cDNA 文库中筛选到不同于成熟

收稿日期: 2010-02-09; 修订日期: 2010-08-25

基金项目: 国家自然科学基金(30630050); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系资助

作者简介: 王锐(1974—), 女, 河北吴桥人; 博士研究生; 主要研究方向为发育遗传学。E-mail: zjgfeixiang@163.com

通讯作者: 桂建芳, E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

卵子差异表达的一系列基因^[12-14]。银鲫的果糖-1,6-二磷酸酶基因就是我们通过斑点杂交筛选到的原肠胚差异表达的基因。本研究克隆了该基因的全长 cDNA, 将其氨基酸序列和人类两种类型的果糖-1,6-二磷酸酶同工酶序列进行了比对, 同时通过原核表达制备该酶的抗体, 分析了该基因在不同组织和胚胎发育中的表达特征, 为研究鱼类的糖代谢打下了分子方面的基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

银鲫取自中国科学院水生生物研究所关桥试验基地。

1.2 *CagFbp1* cDNA 的克隆和序列分析

根据已知 EST 序列, 设计 2 个特异引物: GSP5: 5'-ATGCTTGATCCTGCCATTGGTGA-3'; GSP3: 5'-AGAGTCCTGTGCACATCAGCTAC-3'。采用 RACE 方法从原肠胚的 SMART 库中扩增得到 *CagFbp* 的 5' 上游和 3' 下游序列。将 PCR 产物回收后克隆到 pMD-18T 载体, 重组子转化 DE3 大肠杆菌, 培养过夜; 随机挑取白色菌落, 用 PCR 方法筛选阳性克隆。将鉴定的 3—5 个阳性克隆送交联合基因公司进行测序。应用 DNAclub 分析软件将所得 DNA 序列进行拼接, 翻译成蛋白质序列, 并用 BLAST 搜索引擎查找 GenBank / EMBL 数据库, 获得同源的蛋白质序列。多序列比对采用 Clustal W 软件, 使用 MEGA4 软件以相邻结合(NJ)方法构建系统进化树。将扩增的银鲫果糖-1,6-二磷酸酶的 cDNA 提交 GenBank, 登录号为 GU593002。

1.3 *CagFbp1* 的原核表达及多克隆抗体的制备

以银鲫 *CagFbp1* cDNA 编码 303 个氨基酸的片段设计一对引物, 在 5' 端和 3' 端分别加入了 *EcoR* I 和 *Xho* I 的酶切位点序列, 引物序列为 FBP5: 5'-GAATTCCTTACAACCCTTCTCACTC-3' 和 FBP3: 5'-CTCGAGCTTAAAGATGGAGATATACTCC-3'; 以 SMART cDNA 为模板, 用高保真 *Taq* 酶进行 PCR 反应, 产物插入表达载体 pET-32a, 阳性克隆用 IPTG 诱导重组蛋白表达。将诱导的蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 用干净的刀片准确切下目的条带, 用生理盐水研磨胶条成稀糊状, 调整好浓度免疫 6 只雌性的 BALB/c 鼠, 间隔免疫三次, 收集血液得到多抗血清。

1.4 RT-PCR 检测 *CagFbp1* 转录本的表达特征

用 Promega 公司的 SV Total RNA Isolation Kit 提取银鲫成鱼各组织和各时期胚胎的总 RNA, 具体步骤按照试剂盒说明书进行。取各种 RNA 用逆转录酶 Powerscrit 和 oligo(dT) 合成第一链模板 cDNA。以 GSP5 和 GSP3 为引物, 用各种组织或胚胎的 cDNA 作为模板进行 PCR 反应, 以银鲫 *β -actin* 基因作为对照。

1.5 Western blot 分析 *CagFbp* 蛋白的分布特征

取各种组织和各胚胎阶段的样品, 提取蛋白。将样品和蛋白匀浆缓冲液(80 mmol β -磷酸甘油, 20 mmol HEPEs, 15 mmol EGTA, 20 mmol $MgCl_2$, HCl 调 pH 值至 7.38, 在临用前再加 2 μ g/mL Aprotinin, 1 μ g/mL Leupeptin, 1 mmol DTT, 2 mmol PMSF, 10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL pepstatin, 10 μ g/mL chymostatin)按体积比 1 : 10 混合并进行充分匀浆; 加入等体积的上样缓冲液, 沸水煮 5min, 迅速置于冰上制冷并于 4 $^{\circ}C$, 16000 r/min, 离心 10min; 取上清经 12%SDS-PAGE 胶(Bio-Rad Mini-Protein 电泳系统)分离; 将蛋白转移至硝酸纤维素膜上; 用 5% 脱脂奶粉(溶于 TBS 中)进行室温封闭 1h, 加入一抗孵育液(1:500 稀释 anti-*CagFbp* 鼠血清抗体, 1%脱脂奶粉, 溶于 TBS 中)孵育过夜; 洗膜 3 次后, 加入二抗孵育液(1:2000 稀释 AP-标记羊抗鼠血清, 1%奶粉, 溶于 TBS 中)继续室温孵育 1h; 最后采用 NBT/BCIP 显色试剂盒进行显色。Western blot 以抗 *β -actin* 的抗体为内参调整上样量。

2 结果

2.1 *CagFbp1* cDNA 的克隆和序列分析

本实验室前期分别构建了银鲫原肠胚和成熟卵子的 SMART cDNA 文库, 通过差异筛选的方法, 从银鲫原肠胚 SMART cDNA 文库中筛选到不同于成熟卵子的差异表达基因, 本研究从这些差异基因中鉴定到了银鲫 *Fbp* 基因的序列, 分析表明该基因 cDNA 全长 1170 bp, 其中 1014 bp 的开放阅读框编码 337 个氨基酸。它的 3' 非编码区(UTR)共 62 bp, 5' 非编码区 94 bp。氨基酸序列分析显示, 银鲫 Fbp 由 337 个氨基酸残基组成, 分子量 36715 D, 等电点为 6.95。利用 SignalP3.0 未检测到信号肽, YinOYang 1.2 显示该基因有 4 个潜在的 O-连接糖基化位点(Thr 67, Thr 225, Ser 238, Thr 298), 磷酸化位点预测软件 NetPhos 2.0 分析到存在 13 个潜在的磷酸化位点

(Thr9, Ser97, Ser125, Thr144, Ser149, Ser156, Ser177, Tyr216, Ser239, Ser271, Ser310, Ser321, Ser336)。

把银鲫的 Fbp 氨基酸序列与线虫、果蝇、斑马鱼、爪蟾、鸡、兔、豚鼠、家鼠和人类的氨基酸序列进行多重比对,发现果糖-1,6-二磷酸酶有很强的保守性。所获得的果糖-1,6-二磷酸酶基因的氨基酸序列与肝脏型果糖-1,6-二磷酸酶的相似性较高,最高的是斑马鱼氨基酸序列,为 88%;与其肌肉型果糖-1,6-二磷酸酶的相似性次之;与果蝇和线虫的相似性最低,分别为 63%和 62%。

结合多重比对的动物氨基酸序列,构建了果糖-1,6-二磷酸酶的系统发育树(图 1)。在系统发育树中,果糖-1,6-二磷酸酶肝脏型和肌肉型聚为两个类群,银鲫的该序列聚在了肝脏型的类群,可见我们克隆的果糖-1,6-二磷酸酶属于肝脏型,故命名为 *CagFbp1*。由进化树还可以看出线虫和果蝇的氨基酸序列没有聚在这两个类群的任何一方。

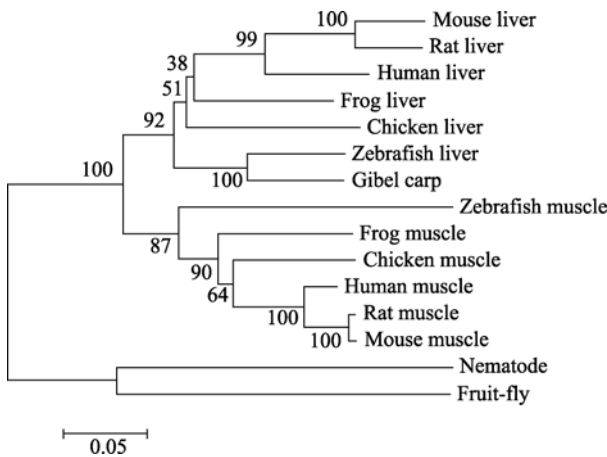


图 1 利用 MEGA4.0 软件对果糖-1,6-二磷酸酶的氨基酸序列进行系统分析构建进化树(NJ 法)

Fig. 1 Phylogenetic (Neighbor-joining) analysis of Fbp sequences using the MEGA4.0 program in animals

水平线的长度代表遗传距离,自展值检验为 1000 次重复抽样,树上节点处的数值为自举检验置信度

Lengths of horizontal lines indicate the genetics distance. One thousand bootstrap repetitions were performed, and values are shown at the inner nodes

2.2 *CagFbp1* 的组织特异性表达分析

不同组织的 RT-PCR 检测(图 2A)表明, *CagFbp1* 在银鲫的肝、脑、心、脾、肾、肠、肌肉和卵巢组织中皆能检测到该基因的表达,但是肝组织的表达量最高,在其他组织中的表达丰度次之。原核表达的 *CagFbp* 蛋白片段免疫小鼠后,制备的鼠抗血清用来检测 *CagFbp* 蛋白在银鲫的不同组织中的表达

特征。Western blot 分析(图 2B)表明,有大约 37 kD 的特异性条带可以在脑、心、肝、脾、肾、肠、肌肉和卵巢组织中检测到,但是在肝脏组织中还有一条分子量略小的特异带,肌肉中有不同于其他组织的特异带。就蛋白的分布量而言,可以发现该蛋白在肝脏中分布量最大,肾脏次之。

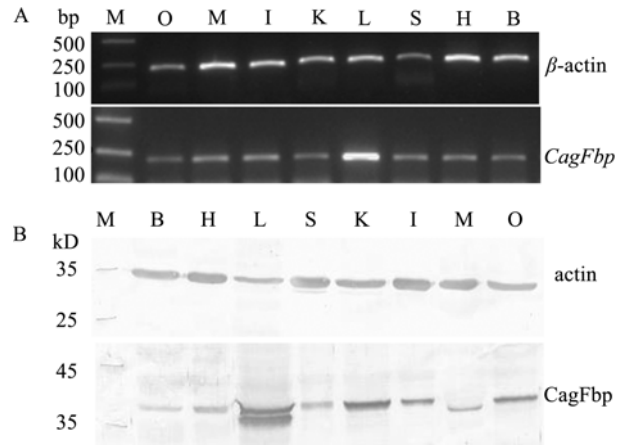


图 2 RT-PCR 和 Western-blot 检测 *CagFbp* 在银鲫组织中的表达特征

Fig. 2 Expression characterization of *CagFbp* in various tissues of the gibel carp

A. *CagFbp* 在不同组织转录水平的 RT-PCR 分析; B. *CagFbp* 蛋白在银鲫组织中的 Western blot 检测; O. 卵巢; B. 脑; H. 心脏; L. 肝; S. 脾; K. 肾; M. 肌肉; I. 肠道

A. RT-PCR detection of *CagFbp* transcripts in various tissues. B. Western blot detection of *CagFbp* protein in various tissues. O. Ovary; B. Brain; H. Heart; L. Liver; S. Spleen; K. Kidney; M. Muscle; I. Intestine

2.3 *CagFbp1* 在胚胎发育过程中的表达图式

采用 RT-PCR 和 Western blot 的方法,对 *CagFbp1* 基因在银鲫成熟卵子和胚胎发育过程中的表达图式进行了分析。*CagFbp1* 转录本是母源存在的,且从原肠期开始上升,到神经胚时迅速上升到较高水平,该基因的高水平表达一直持续到出苗(图 3A)。Western blot 检测到母源 *CagFbp1* 蛋白存在于成熟卵母细胞,但是从尾芽期以后可以检测到一条比母源蛋白分子量小,与肝脏的特异带大小基本相同的蛋白带,两条蛋白带一直维持到出苗以后的幼鱼阶段(图 3B)。

3 讨论

目前的文献报道显示在所有的陆生脊椎动物(哺乳动物、鸟类、爬行类和两栖类)中存在两种果糖-1,6-二磷酸酶基因,因此存在两种同工酶^[4,7,9]。肝

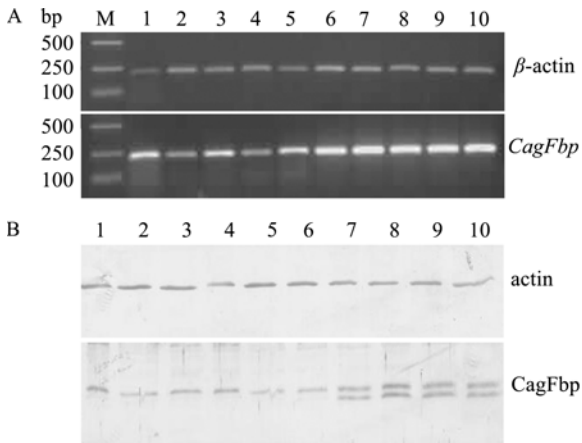


图3 RT-PCR和Western-blot检测 *CagFbp* 在银鲫胚胎发育中的表达特征

Fig. 3 Expression characterization of *CagFbp* during gibel carp embryogenesis

A. *CagFbp* 在不同胚胎发育阶段转录水平的 RT-PCR 分析;
B. *CagFbp* 蛋白在银鲫不同胚胎发育阶段的 Western blot 检测;
1. 成熟卵; 2. 受精卵; 3. 多胞期; 4. 囊胚; 5. 原肠胚; 6. 神经胚;
7. 尾芽期; 8. 心跳期; 9. 出苗前期; 10. 出苗期

A. RT-PCR detection of *CagFbp* transcripts during gibel carp embryogenesis. B. Western blot detection of CagFbp protein during gibel carp embryogenesis. 1. mature egg; 2. fertilized egg; 3. multicellular stage; 4. blastula; 5. gastrula; 6. neurula; 7. tail bud stage; 8. heartbeat stage; 9. hatching embryos; 10. hatched larvae

脏果糖-1,6-二磷酸酶参与糖异生, 主要分布在肝脏、肾脏和肺组织中^[1-3]。肌肉果糖-1,6-二磷酸酶参与乳糖合成糖元的生化过程^[15,16], 因此是骨骼肌组织的唯一同工酶。在其他的组织中两种同工酶可能同时存在^[7]。两种酶都可以被单价阳离子例如 K、NH₃ 所激活, 被果糖-2,6-二磷酸竞争性抑制, 同时被 AMP 异构调节, 但是两种酶对 AMP 的敏感程度不同^[7,9]。在鱼类中关于果糖-1,6-二磷酸酶报道较少, 尽管鱼类骨骼肌具有较高的果糖-1,6-二磷酸酶活性, 而且该同工酶具有所有脊椎动物果糖-1,6-二磷酸酶酶动力学性质, 但是没有扩增到鱼类的肌肉型果糖-1,6-二磷酸酶基因的 mRNA^[9]。我们从银鲫原肠胚 SMART cDNA 文库中扩增到 *Fbp* 基因序列, 多序列比对结果显示其为肝脏型果糖-1,6-二磷酸酶基因, 利用 RT-PCR 方法分析其转录本在不同组织中表达, 虽然各种组织中都有表达, 但是在肝脏中有较高水平的表达, 在肌肉组织中也扩增到该基因的片段, 说明该基因和肌肉型果糖-1,6-二磷酸酶基因具有较高的同源性, 也可能在银鲫中肝脏型果糖-1,6-二磷酸酶基因在肌肉中表达。进一步我们将该基因的 303 氨基酸进行了原核表达, 制备了多克

隆抗体, 进行 Western Blot 分析, 发现其在肝脏组织中可以检测到两条特异带, 而在肌肉组织中只有一条带分布。这存在三种情况, 首先肝脏中的果糖-1,6-二磷酸酶可能有两种不同的修饰类型使其出现两条带; 也有可能是肝脏中存在的次带为肌肉型果糖-1,6-二磷酸酶, 而肌肉中仅仅分布肌肉型果糖-1,6-二磷酸酶同工酶, 所以只有一条带被识别出来; 此外还有可能除了肝脏型和肌肉型两种果糖-1,6-二磷酸酶外还存在一种较普遍分布的果糖-1,6-二磷酸酶, 由此推测鱼类中至少存在两种类型的果糖-1,6-二磷酸酶。以后需要进一步克隆鱼类肌肉型果糖-1,6-二磷酸酶基因, 以便准确的分析其分布和生理功能。进化分析认为, 在哺乳动物、鸟类、爬行类和两栖类中两种同工酶基因的分化发生的时间要比鱼类和陆生动物的分化晚, 因此推测, 在进化过程中存在两次独立的果糖-1,6-二磷酸酶基因的复制事件^[9]。

在生理上糖分解和糖异生中关键酶的活性调节有几种机制, 例如异构调节、共价修饰(蛋白的磷酸化和去磷酸化)和激素的调节等。糖异生中的三个关键的限速酶, 其中果糖-1,6-二磷酸酶和葡萄糖-6-磷酸酶主要借助异构调节和共价修饰进行短期调节^[17,18], 而磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶主要受到酶产量的长期调节^[19]。在水产养殖中提高鱼类对碳水化合物的利用率可以降低饲料成本, 但是很多鱼类利用碳水化合物能力又非常有限。在虹鳟中的研究表明在日粮中提高糖的含量可以诱导糖分解酶葡萄糖激酶的产生, 但是没有像哺乳动物那样抑制糖异生三个关键酶的表达。因此人们推测虹鳟利用日粮中碳水化合物的能力低, 可能是由于肝脏中持续高糖水平造成的^[20-23]。在我们分析的银鲫果糖-1,6-二磷酸酶氨基酸序列中也发现了其存在较多的磷酸化位点, 说明其受到共价修饰的调节。目前关于肌肉果糖-1,6-二磷酸酶的生理功能了解还不多。近些年的研究表明在哺乳动物肌肉中 50% 以上的乳糖通过糖异生被转化成糖元^[24]。鱼类的白肌产生大量乳糖, 同时聚集大量的糖元, 然而白肌中由于缺乏磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶而不能由乳糖原位合成葡萄糖-6-磷酸^[18,19]。因此人们认为在鱼类白肌中产生的乳糖直接运到红肌中转化成葡萄糖, 葡萄糖返回到白肌再产生糖元^[19]。近来又提出丙酮酸激酶催化的反应是可逆的, 因此没有磷酸烯醇式丙酮酸羧

化酶也可以糖异生^[17]。这些研究说明有必要进一步鉴定鱼类的肌肉型果糖-1,6-二磷酸酶,并阐明其不同于肝脏型果糖-1,6-二磷酸酶的生理作用。

在本研究中我们首次报道了果糖-1,6-二磷酸酶基因在银鲫成熟卵子和不同发育阶段的胚胎及幼鱼中的表达情况,RT-PCR 和 Western Blot 分析都可检测到母源的 *CagFbp* 转录本和蛋白,且其转录本从原肠期开始上升,到神经胚时迅速上升到较高水平,其蛋白从尾芽期以后出现一条比母源蛋白分子量小、与肝脏的特异带大小基本相同的蛋白带。结合上面组织特异性表达分析,母源表达的蛋白可能是肝脏型果糖-1,6-二磷酸酶也可能是另外的一种遍在表达的形式,尾芽期以后存在两条蛋白带,尾芽期是器官原基发育的时期,表明相应的组织特异性果糖-1,6-二磷酸酶开始翻译,可能在器官发育的早期起到重要的生理作用。总之本研究在银鲫成体组织和胚胎发育过程中分析了果糖-1,6-二磷酸酶的表达模式,证实了在鱼类至少存在两种果糖-1,6-二磷酸酶的同工酶,为进一步研究该酶的生理作用打下了基础。

参考文献:

- [1] Mizunuma H, Tashima Y. Fructose-1,6-bisphosphatase of the small intestine. Purification and comparison with liver and muscle fructose-1,6-bisphosphatases [J]. *The Journal of Biochemistry*, 1978, **84**(2): 327—336
- [2] Tejwani G A. Regulation of fructose-bisphosphatase activity [J]. *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology*, 1983, **54**: 121—194
- [3] Skalecki K, Rakus D, Wisniewski J R, *et al.* cDNA sequence and kinetic properties of human lung fructose-1,6- bisphosphatase [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, **365**: 1—9
- [4] Tillmann H, Eschrich K. Isolation and characterization of an allelic cDNA for human muscle fructose -1, 6- bisphosphatase [J]. *Gene*, 1998, **212**: 295—304
- [5] Fernando J, Enser M, Pontremoli S, *et al.* Purification and properties of rabbit muscle fructose-1, 6-bisphosphatase [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1968, **126**: 599—606
- [6] Enser M, Shapiro S, Horecker B L. Immunological studies of liver, kidney and muscle fructose-1,6-bisphosphatase [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1969, **129**: 377—383
- [7] Al-Robaiy S, Eschrich K. Rat muscle fructose-1, 6-bisphosphatase: Cloning of the cDNA, expression of the recombinant enzyme, and expression analysis in different tissues [J]. *Biological Chemistry*, 1999, **380**: 1079—1085
- [8] Tillmann H, Stein S, Liehr T, *et al.* Structure and chromosomal localization of the human and mouse muscle fructose-1, 6-bisphosphatase genes [J]. *Gene*, 2000, **247**: 241—253
- [9] Tillmann H, Bernhard D, Eschrich K. Fructose-1,6-bisphosphatase genes in animals [J]. *Gene*, 2002, **291**: 57—66
- [10] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* bloch) as revealed by RAPD assays [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2000, **51**: 498—506
- [11] Gui J F, Zhou L. Genetic basis and breeding application on clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio* [J]. *Science in China Series C*, 2010, **40**(2): 1—7 [桂建芳, 周莉. 多倍体银鲫克隆多样性和双重生殖方式的遗传基础和育种应用. 中国科学 C 辑, 2010, **40**(2): 1—7]
- [12] Liu J X, Shi Y H, Gui J F. Screen of different expressed genes at gastrula stage during embryogenesis of *Carassius auratus gibelio* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(4): 359—365 [刘静霞, 石耀华, 桂建芳. 银鲫原肠胚差异表达基因的筛选. 水生生物学报, 2005, **29**(4): 359—365]
- [13] Xia J H, Liu J X, Zhou L, *et al.* Apo-14 is required for digestive system organogenesis during fish embryogenesis and larval development [J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2008, **52**: 1089—1098
- [14] Peng J X, Xie J L, Zhou L, *et al.* Evolutionary conservation of Dazl genomic organization and its continuous and dynamic distribution throughout germline development in gynogenetic gibel carp [J]. *Journal of Experimental Zoology Part B*, 2009, **312B**: 855—871
- [15] Ryan C, Radziuk J. Distinguishable substrate pools for muscle glyconeogenesis in lactate-supplemented recovery from exercise [J]. *American Journal of Physiology*, 1995, **269**, E538—E550
- [16] Gleeson T T. Post-exercise lactate metabolism: A comparative review of sites, pathways, and regulation [J]. *Annual Review of Physiology*, 1996, **58**: 565—581
- [17] Fournier P A, Fairchild T J, Ferreira L D. Post-exercise muscle glycogen repletion in the extreme: effect of food absence and active recovery [J]. *Journal of Sports Science Medicine*, 2004, **3**: 139—146
- [18] Suarez R K, Mommsen T P. Gluconeogenesis in teleost fishes [J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1987, **65**: 1869—1882
- [19] Knox D, Walton M J, Cowey C B. Distribution of enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in fish tissues [J]. *Marine Biology*, 1980, **56**: 7—10
- [20] Panserat S, Médale F, Blin C, *et al.* Hepatic glucokinase is induced dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead

- seabream (*Sparus aurata*) [J]. *American Journal of Physiology*, 2000, **278**: R1164—R1170
- [21] Panserat S, Médale F, Brèque J, *et al.* Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on glucose-6-phosphatase expression in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2000, **11**(1): 22—29
- [22] 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**: 359—365
- [23] Panserat S, Plagnes-Juan E, Brèque J, *et al.* Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for key proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2001, **204**: 2351—2360
- [24] Fournier P A, Brau L, Ferreira L D, *et al.* Glycogen resynthesis in the absence of food ingestion during recovery from moderate or high intensity physical activity: novel insight from rat and human studies [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 2002, **133**: 755—763

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF FRUCTOSE-1, 6-BISPHOSPHATASE IN GIBEL CARP

WANG Rui^{1,2,3}, XIAO Qing^{1,2} and GUI Jian-Fang¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049; 3. Hubei Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023)

Abstract: Fructose-1,6-bisphosphatase is one of the key rate-limiting enzymes in gluconeogenesis, which plays important roles in carbohydrate metabolism. Mammals have two isoforms, liver and muscle fructose-1, 6-bisphosphatase encoded by *Fbp1* and *Fbp2* respectively. Gibel carp is widely cultured as an economic fish in China. However, the fructose-1, 6-bisphosphatase gene has not been elucidated in teleosts, especially its tissue distribution in adult fish and spatiotemporal expression in embryogenesis. In this study, we cloned the full-length cDNA of gibel carp *Fbp1* by RACE polymerase chain reaction from the gastrula embryo SMART cDNA library, and we also examined its expression pattern in the tissues of adult fish and the developmental process of embryos in this fish by gene specific primers. The full length sequence of *CagFbp1* consists of 1170 base pairs which encodes 337 amino acids. Multiple alignment and phylogenetic analysis showed that the cloned gene was liver Fbp of gibel carp. The tissue expression pattern analysis by RT-PCR with specific primers showed that *CagFbp1* was expressed in the liver, brain, heart, spleen, kidney, intestine, muscle and ovary, and the expression in the liver was obviously higher than others. At the same times, there were two protein bands in liver by western blot analysis, one was common in the detected tissue except muscle, and the other was specific for liver. However, only one band emerged in the muscle, which was specific for muscle tissues. Mature eggs and ontogenic analysis by RT-PCR and western blotting with specific primers showed that both the transcripts and proteins of *CagFbp1* were maternal. The transcripts were increased from gastrula and reached a higher level in neurula till hatching. Interestingly, there was a new band with smaller molecular weight other than the maternal proteins after tail bud stage, which was similar to the liver specific band. These results indicated that the fructose-1,6-bisphosphatase gene cloned in gibel carp was liver isoform, and there might be at least two isoenzymes, the liver fructose-1, 6-bisphosphatase and muscle one in teleost.

Key words: *Carassius auratus gibelio*; Fructose-1,6-bisphosphatase; Gene cloning; Expression pattern