

大口黑鲈G6pc和Gck的原核表达、抗体制备及饲料淀粉水平对其表达的影响

夏如 孙皓 王康伟 莫丁瑞 黄正 何远法 林仕梅 陈拥军

PROKARYOTIC EXPRESSION, ANTIBODY PREPARATION, AND REGULATION BY DIETARY STARCH LEVELS OF G6PC AND GCK IN *MICROPTERUS SALMOIDES*

XIA Ru, SUN Hao, WANG Kang-Wei, MO Ding-Rui, HUANG Zheng, HE Yuan-Fa, LIN Shi-Mei, CHEN Yong-Jun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2024.2024.0180>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

大口黑鲈 amh 基因全长cDNA克隆、表达及多克隆抗体制备

MOLECULAR CLONING, EXPRESSION ANALYSIS AND POLYCLONAL ANTIBODY PREPARATION OF ANTI-MLLERIAN HORMONE (amh) GENE IN LARGEMOUTH BASS *MICROPTERUS SALMOIDES*

水生生物学报. 2023, 47(5): 775–785 <https://doi.org/10.7541/2022.2021.0343>

莱茵衣藻BBS8蛋白的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备

PROKARYOTIC EXPRESSION, PURIFICATION AND POLYCLONAL ANTIBODY PREPARATION OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* BBS8

水生生物学报. 2022, 46(9): 1319–1324 <https://doi.org/10.7541/2022.2021.0146>

黄颡鱼Cu稳态相关基因 ccs 和 $cox17$ 的原核表达及多克隆抗体制备

PROKARYOTIC EXPRESSION AND POLYCLONAL ANTIBODY PREPARATION OF CU HOMEOSTASIS-RELATED GENES *CCS* AND *COX17* IN YELLOW CATFISH *TACHYSURUS FULVIDRACO*

水生生物学报. 2023, 47(10): 1609–1616 <https://doi.org/10.7541/2023.2022.0441>

饲料中添加胆酸钠对大口黑鲈生长及糖代谢的影响

EFFECTS OF SODIUM CHOLATE ON GROWTH AND GLUCOSE METABOLISM OF LARGEMOUTH BASS (*MICROPTERUS SALMOIDES*)

水生生物学报. 2022, 46(8): 1177–1186 <https://doi.org/10.7541/2022.2021.043>

鳊对葡萄糖和糊精利用差异比较研究

COMPARATIVE STUDY OF THE DIFFERENCE IN GLUCOSE AND DEXTRIN UTILIZATION IN THE CHINESE PERCH (*SINIPERCA CHUATSI*)

水生生物学报. 2020, 44(2): 364–371 <https://doi.org/10.7541/2020.044>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2024.2024.0180

CSTR: 32229.14.SSSWXB.2024.0180

大口黑鲈G6pc和Gck的原核表达、抗体制备及饲料淀粉水平对其表达的影响

夏如 孙皓 王康伟 莫丁瑞 黄正 何远法 林仕梅 陈拥军

(西南大学水产学院, 水产科学重庆市市级重点实验室, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 北碚 400715)

摘要: 为深入研究营养因子调控大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)葡萄糖稳态的分子机制, 研究成功克隆并构建了大口黑鲈葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基(G6pc)和葡萄糖激酶(Gck)截短序列的重组质粒载体, 转化至*Escherichia coli* Rosetta感受态细胞并以1 mmol/L IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)、16℃诱导表达过夜, 在细胞破碎后的上清中得到了大量表达。通过GST-tag亲和层析的方法纯化得到高纯度的G6pc和Gck截短重组蛋白后, 将其分别与弗氏佐剂乳化成免疫原, 免疫KM小鼠5次, 成功制备具有高特异性和高效价的多克隆抗体(G6pc和Gck抗体的效价分别大于1:3000和1:10000)。Western blot检测发现大口黑鲈G6pc和Gck蛋白主要分布在肝脏中, 免疫荧光染色显示G6pc的阳性信号定位于细胞核周围, 而Gck的阳性信号散布整个细胞。在8周养殖实验结束后, 随饲料淀粉水平以6%的梯度从8%增加到20%, 大口黑鲈肝脏中糖酵解和糖原合成关键酶编码基因的表达及Gck水平逐渐升高, 但糖异生和糖原分解关键酶编码基因的表达及G6pc水平仅在14%淀粉水平时被抑制, 意味着在高淀粉水平(20%)下大口黑鲈肝脏中葡萄糖-G6P间的相互转化发生了无效循环。综上所述, 研究成功制备了大口黑鲈G6pc和Gck特异性识别的多克隆抗体, 探明了饲料淀粉水平对其表达的影响, 为深入研究G6pc和Gck在大口黑鲈葡萄糖稳态维持过程中的重要作用奠定了基础。

关键词: 葡萄糖-6-磷酸酶; 葡萄糖激酶; 原核表达; 多克隆抗体; 大口黑鲈

中图分类号: S965.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2024)11-1835-10



葡萄糖是动物机体重要的能量来源, 血糖稳态的维持对动物的生长存活至关重要^[1]。在动物体内, 肝脏中葡萄糖磷酸化和去磷酸化的速率及通量会直接影响血糖稳态的控制^[2]。葡萄糖激酶(Glucokinase, GCK), 又称己糖激酶IV, 是糖酵解途径的第一个限速酶, 负责催化葡萄糖的磷酸化生成葡萄糖-6-磷酸(Glucose-6-phosphate, G6P)^[3-5]。葡萄糖-6-磷酸酶(Glucose-6-phosphatase, G6Pase)负责催化G6P去磷酸化为葡萄糖, 是糖异生途径和糖原分解途径共用的最后一步关键代谢反应^[6, 7]。G6Pase由葡萄糖催化亚基(由G6PC基因编码)和葡萄糖转运子组成, 其中G6PC是一种具有9次跨膜结构的内质网膜蛋白^[7]。在哺乳动物中, GCK和G6PC在机体葡

萄糖稳态中所扮演的角色已然明确^[1]。与哺乳动物相比, 鱼类的糖利用能力相对低下且与其食性密切相关, 以肉食性鱼类的糖耐受能力最低^[8]。以虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)作为代表鱼种, 葡萄糖-G6P间的无效循环被认为是肉食性鱼类糖耐受能力低下的重要原因^[9, 10], 但这一现象未在蛋白水平予以验证, 且未在其他肉食性鱼类中得到充分证明, 而鱼类特异性Gck和G6pc抗体的缺乏是检验这一论断是否具有普适性的根本障碍。

因其环境适应性强、生长速度快、无肌间刺、味道鲜美和营养价值高等优点, 大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)已成为我国最主要的淡水鱼养殖品种之一。大口黑鲈的糖利用能力低于其他常

收稿日期: 2024-04-29; 修订日期: 2024-06-11

基金项目: 重庆市生态渔产业技术体系(2022); 西南大学研究生科研创新项目(SWUS23141)资助 [Supported by Chongqing Ecological Fishery Technology System (2022); Graduate Research Innovation Project of Southwest University (SWUS23141)]

作者简介: 夏如(1997—), 男, 硕士研究生; 主要研究方向为水产动物营养与饲料学。E-mail: xia284653409@163.com

通信作者: 陈拥军(1986—), 男, 副教授; 主要研究方向为水产动物营养与饲料学。E-mail: chenycjq@swu.edu.cn

见的肉食性鱼类,当饲料中淀粉含量超过10%左右便会诱导代谢性肝病的产生^[11,12],但导致这一现象的潜在机制仍不清楚。现有研究显示,投喂高淀粉饲料会促进大口黑鲈肝脏中 gck 的表达^[13],但其是否可抑制肝脏中 $G6pc$ 的表达(转录水平或酶活性)尚无定论。Ma等^[12]报道,饲料淀粉含量从5%增加至20%会降低大口黑鲈肝脏中 $G6Pase$ 的活性,但Lin等^[14]发现,饲料淀粉水平(0—20%)并不影响肝脏中 $G6Pase$ 的活性。尽管先前有报道显示饲料淀粉水平并不影响大口黑鲈肝脏中 $g6pca.1$ 的表达^[15,16],但研究发现饲料淀粉水平从9.25%增加至14.3%会抑制肝脏中 $g6pca.1$ 的表达,且 $g6pca.2$ 的表达亦呈现下降趋势^[17],亟待从蛋白质水平上予以验证。因此,本研究对大口黑鲈 $G6pc$ 和 Gck 蛋白进行了原核表达和多克隆抗体制备,鉴定了其组织表达和亚细胞定位。在此基础上,研究了饲料淀粉水平对大口黑鲈肝脏中 Gck 和 $G6pc$ 表达(转录和蛋白水平)的影响,研究结果有利于揭示 Gck 和 $G6Pase$ 在大口黑鲈葡萄糖稳态中扮演的角色。

1 材料与方法

1.1 材料

pGEX-4T-3原核表达载体质粒由本实验室保存, $BamH$ I 限制性核酸内切酶(No. 1605)、 Xho I 限制性核酸内切酶(1635)、DNA连接试剂盒(6023)、逆转录试剂盒(6210A)、DNA纯化试剂盒(9761)、高保真DNA聚合酶(R045A)、TB Green[®]预混 Taq 酶(RR820A)和RNAiso Plus裂解液(No. 9109)购自TaKaRa生物技术(北京)有限公司。GST标签蛋白纯化试剂盒(P2262)、弗氏完全佐剂(P2036)、弗氏不完全佐剂(P2031)、IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷,ST098)、考马斯亮蓝快速染色液(P0017)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0010)、1×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(P0015A)、5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(P0015)、SDS裂解液(P0013G)和蛋白酶抑制剂(P1005)购自碧云天生物技术(北京)有限公司。*Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞(CB101)、*E. coli* Rosetta感受态细胞(CB105)、胶回收试剂盒(DP209)和质粒小提试剂盒(DP103)购自天根生化科技(北京)有限公司。GST-tag单克隆抗体(30901ES10)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。 β -actin内参抗体(GB15001)购自塞维尔生物科技(武汉)有限公司。HRP标记山羊抗小鼠IgG(WB0176)和PAGE快速凝胶试剂盒(WB610C)购自威奥生物科技(上海)有限公司。脱脂牛奶(A600669-0250)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。PVDF膜(0.45 μ m,

BS-PVDF-45)购自兰杰柯科技(北京)有限公司。4—6周龄SPF级KM小鼠购自斯莱克景达实验动物(湖南)有限公司,所有实验过程均遵循西南大学动物伦理委员会的相关规定。

1.2 方法

养殖实验 大口黑鲈幼鱼(约4.1 g)购自从重庆海峡两岸农业发展(重庆)海峡两岸农业发展有限公司。鱼油购自海大饲料(重庆)有限公司,多维多矿购自诚一水产科技(广州)有限公司,鱼粉、木薯淀粉、谷朊粉、鸡肉粉和豆粕等均购自斯特佳饲料(重庆)有限公司。以木薯淀粉为糖源,采用纤维素调平,按照王康伟^[18]所述配制和制作了3组实验饲料,淀粉水平分别为8%、14%和20%(表1)。将大口黑鲈幼鱼暂养2周,期间每天投喂商业饲料(广东海大集团有限公司)两次。暂养结束后,选取规格一致的大口黑鲈幼鱼(约6.4 g)随机分配(每缸20尾)至由9个矩形玻璃缸组成的循环水系统中。养殖实验期间每天投喂两次(上午9:00,下午17:00),直至表观饱食。在8周养殖实验结束后,将实验鱼禁食24h,集体称重(8%、14%和20%淀粉组实验鱼终末体重分别约为82.5、80.9和78.4 g),每缸随机取6尾使用MS-222麻醉,其中3尾用罗氏血糖仪测定血糖,剩余3尾解剖获取肝组织(8%淀粉组采集肝脏、心脏、肌肉和肠道组织),液氮速冻后转移至-80℃保存。所有实验过程均遵循西南大学动物伦

表1 实验饲料配方及营养组成(干物质)

Tab. 1 Formulation and nutritional composition of the experimental diets (dry matter basis)

原料Ingredient (%)	S8	S14	S20
木薯淀粉Cassava starch	7.00	14.00	19.00
微晶纤维素Microcrystalline cellulose	6.85	6.00	1.69
沸石粉Zeolite powder	6.84	1.69	0.00
其他Others ¹	79.3	79.3	79.3
营养组成Proximate composition (Analyzed, % dry matter)			
水分Moisture	7.93	9.85	9.64
粗蛋白Crude protein	49.1	49.3	49.8
粗脂肪Crude lipid	11.4	11.6	11.6
淀粉Starch	8.13	14.1	20.1
灰分Ash	18.3	13.6	12.0

注:¹鱼粉. 34.0; 豆粕. 7.50; 谷朊粉. 15.0; 鸡肉粉. 13.0; 鱼油. 2.40; 豆油. 2.40; 磷酸二氢钙. 2.00; 多维多矿. 2.00; 维生素C磷酸酯. 0.20; 蛋氨酸. 0.25; 氯化胆碱. 0.50; 防腐剂. 0.01; 抗氧化剂. 0.05

Note: ¹ Fish meal. 34.0; soybean meal. 7.50; wheat gluten. 15.0; chicken meal. 13.0; fish oil. 2.40; soybean oil. 2.40; monocalcium phosphate. 2.00; vitamin and mineral premix. 2.00; VC phosphate. 0.20; methionine. 0.25; choline chloride. 0.50; antiseptic. 0.01; antioxidant. 0.05

理委员会的相关规定。

构建pGEX-G6pc和pGEX-Gck重组表达载体

在NCBI中下载大口黑鲈的*g6pc* (*g6pca.2*, 登录号: ON246072)和*gck*基因(登录号: ON246073)的cDNA序列, 使用DNAMAN 6.0软件预测编码氨基酸序列, 通过Protean 7.1.0和ChimeraX 1.4软件分析蛋白质理化性质和三级结构, 利用SnapGene6.0.2软件确定酶切位点, 使用Primer Premier 5软件设计PCR扩增引物。引物序列如表2所示。

根据王康伟^[18]所述方法使用RNAiso Plus裂解液提取组织中的总RNA并测定浓度。根据逆转录试剂盒说明, 将总RNA逆转录为cDNA, 使用高保真DNA聚合酶进行目标基因cDNA的PCR扩增。PCR反应体系(50 μL)包含2×高保真酶 25 μL, 上、下游引物各1 μL, cDNA模板2 μL, 无酶水21 μL。PCR反

应条件为: 95℃ 5min; 95℃ 5s, 60℃ 15s, 72℃ 2min, 37个循环; 72℃ 10min。之后使用1.2%的琼脂糖凝胶120 V电泳40min, 使用胶回收试剂盒回收目的条带。利用*Bam*H I 和*Xho* I 限制性核酸内切酶分别对pGEX质粒载体和回收产物进行双酶切, 按照DNA纯化试剂盒说明纯化酶切产物并检测浓度。按照DNA连接试剂盒说明将酶切后的pGEX载体和PCR产物1:3混匀后16℃连接过夜。将连接后的重组质粒转化进*E. coli* DH5α感受态细胞, 菌液涂布于LB平板, 37℃培养14h。挑取单菌落进行扩培后提取质粒进行PCR鉴定, 并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

诱导表达G6pc和Gck重组蛋白 将测序正确的重组质粒以及空载质粒分别转化进*E. coli* Rosetta感受态细胞中, 菌液涂布于LB平板, 37℃培

表2 引物序列

Tab. 2 Primer sequences

名称Name	引物序列Primer sequences (5'—3')	退火 T_M (°C)	产物Product (bp)
截短表达载体构建Truncated expression vector construction			
pGEX-G6pc-F	CGGGATCCATGAACGCTATAATGGACACCATGC	60.0	380
pGEX-G6pc-R	CCGCTCGAGTTACATAGCATGTCCAGAGGGGCTG		
pGEX-Gck-F	CGGGATCCATGCCGTGTGTCTCCTCTCAT	60.0	1394
pGEX-Gck-R	CCGCTCGAGTTACTCCGACTGGATGAAGGTG		
实时荧光定量PCR Quantitative Real-time PCR			
<i>g6pca.1</i> -F	ACTTCCTTCGCTGTTGGCTT	60.5	150
<i>g6pca.1</i> -R	ACCCATGTTACGCAGTAGGC		
<i>g6pca.2</i> -F	TTCCCGCTTTGGTTTCACCT	61.0	195
<i>g6pca.2</i> -R	AGTCTCACAGGTCATGGGGT		
<i>gck</i> -F	CTCGCTCTGCTCGTATGT	55.0	207
<i>gck</i> -R	CTCCCTTCCTCCGACTG		
<i>pepck</i> -F	ACGTCAACTGGTTCCGCAAGA	65.0	142
<i>pepck</i> -R	TGAGGCAGGTAGCCACAGC		
<i>pfkla</i> -F	TGCGTGAGGGAGTTTTG	62.0	176
<i>pfkla</i> -R	CTTGTGTCCGTGAGCGAG		
<i>pk</i> -F	CGCTCTGCCCAGGATGTCAAAG	65.0	142
<i>pk</i> -R	CAACCATCACGCCGTCCTCTC		
<i>gys</i> -F	TTATTCTCTCTCGCTCCCG	62.0	150
<i>gys</i> -R	TCTGCCTATCACCTGCCTC		
<i>pygl</i> -F	AACCAACGGCATCACTC	58.5	144
<i>pygl</i> -R	AGGGCAGCATTATCAACA		
<i>glut2</i> -F	CTGGAAGAGATGAGGAGAG	57.5	155
<i>glut2</i> -R	GAGCGGATAAACAGAATG		
<i>eef1a1</i> -F	GTTGCTGCTGGTGTGGTGAG	60.0	156
<i>eef1a1</i> -R	GAAACGCTTCTGGCTGTAAGG		

注: *g6pc*. 葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基; *gck*. 葡萄糖激酶; *pepck*. 磷酸烯醇丙酮酸羧激酶; *pfk*. 磷酸果糖激酶; *pk*. 丙酮酸激酶; *gys*. 糖原合酶; *pygl*. 糖原磷酸化酶; *glut*. 葡萄糖转运蛋白; *eef*. 真核翻译延伸因子

Note: *g6pc*. glucose-6-phosphatase catalytic; *gck*. glucokinase; *pepck*. phosphoenolpyruvate carboxykinase; *pfk*. phosphofructokinase; *pk*. pyruvate kinase; *gys*. glycogen synthase; *pygl*. phosphorylase glycogen, liver; *glut*. glucose transporter; *eef*. eukaryotic translation elongation factor

养14h。挑取单菌落将其在5 mL液体培养基中37℃培养5—10h,之后将菌液加入到200 mL液体培养基中37℃培养约2—3h(至菌液OD₆₀₀≈0.6),待菌液冷却至16℃以下后,加入终浓度为1 mmol/L的IPTG,在16℃、120 r/min的条件下过夜诱导表达(约12—16h)。在此期间分别收集经IPTG诱导前和诱导后的菌液,12000 r/min离心10min后弃上清后加入1×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液吹打重悬,100℃热变性10min后进行SDS-PAGE凝胶电泳和考马斯亮蓝染色来确定目的蛋白的诱导表达情况。

纯化、鉴定G6pc和Gck重组蛋白 离心收集(4000 r/min, 20min)经IPTG成功诱导表达后的菌体,加入10 mL PBS缓冲液重悬菌体,使用超声波细胞粉碎机冰水浴超声破碎菌体(40%功率,工作3s,间歇6s,共10min),之后4℃、12000 r/min离心20min,分别收集适量沉淀和上清液进行SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色鉴定重组蛋白表达,并使用GST标签蛋白纯化试剂盒纯化。将1 mL体积的GST-tag纯化凝珠使用PBS缓冲液洗涤3次后加入至10 mL破菌后的上清液中,120 r/min冰浴摇动3—5h,之后装入亲和层析柱中并用PBS缓冲液洗涤5—8次。洗柱后在层析柱中加入500 μL含GSH的洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L GSH, pH 8.0),缓慢混匀2—3min后收集洗脱液,重复洗脱3—5次后,取适量洗脱液用于SDS-PAGE电泳和考马斯亮蓝染色,最后使用GST标签抗体对纯化产物进行Western blot鉴定。

制备鼠源G6pc和Gck多克隆抗体 对KM小鼠共进行5次免疫,每两次免疫之间间隔两周。第1次免疫:将纯化后的重组蛋白与弗氏完全佐剂1:1混合并使用注射器反复抽吸,乳化至形成粘稠的乳剂且滴在水中长时间不扩散后对小鼠进行腹腔注射(每只注射30—50 μg蛋白);第2—4免疫:重组蛋白与弗氏不完全佐剂1:1混合并充分乳化后对小鼠进行腹腔注射(每只注射10—30 μg蛋白);第5次免疫:直接腹腔注射重组蛋白(每只注射30—100 μg蛋白)。最后1次免疫1周后采用乙醚麻醉小鼠,眼球采血后室温放置1h,再4℃静置过夜,4℃、4000 r/min离心20min后收集血清即为制备的多克隆抗体。所有实验过程均遵循西南大学动物伦理委员会的相关规定。

实时荧光定量 PCR同上文所述方法提取组织中的总RNA并逆转录为cDNA,按1:10的比例用DEPC水将cDNA稀释,采用表1中的引物进行实时荧光定量PCR。PCR体系和程序按照TB Green[®]预混Taq酶的试剂盒说明以及不同引物的退火温度

进行设置。mRNA 转录水平以*eef1a1*(真核翻译延伸因子1α1)作为内参基因并进行归一化处理^[19]。目标基因的相对表达量根据以下公式计算: $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ^[20],本研究中目的基因的扩增效率在98%—104%。

蛋白质印迹 Western blot 取大口黑鲈新鲜肝组织100 mg,加入1 mL 预冷的SDS裂解液和蛋白酶抑制剂后充分研磨组织,并使用超声波细胞粉碎机冰水浴超声破碎(40%功率,工作2s,间歇8s,共2min),离心后取上清液,使用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度并加入5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,涡旋混匀后使用液氮进行速冻,并于-80℃分装保存。用于分析G6pc的组织蛋白样品室温变性30min(G6pc为跨膜蛋白,不适合高温变性,高温加热会使跨膜蛋白形成多聚体,导致条带无法检出或位置错误^[21]),其余蛋白样品100℃变性10min。使用PAGE快速凝胶试剂盒(10%)制备SDS-PAGE凝胶,加入蛋白样品后进行电泳(80 V, 30min; 120 V, 60min)和转膜(100 V, 70min),转印后使用5%脱脂牛奶封闭2h,一抗4℃孵育过夜,洗膜后用HRP标记的二抗室温孵育2h,再次洗膜后显影,使用Image J测量条带灰度值。

鉴定G6pc和Gck多克隆抗体 使用GST标签蛋白、重组蛋白及组织蛋白样品对制备的多克隆抗体进行Western blot鉴定,确定抗体特异性。将制备的抗体按多个比例稀释,使用肝组织蛋白进行Western blot检测,分析抗体的效价。使用多聚甲醛固定肝组织,送样至塞维尔生物科技(武汉)有限公司制作石蜡切片,并用制备的抗体进行免疫荧光染色,确定目标蛋白的亚细胞定位情况。

统计分析 使用SPSS 23.0软件进行数据分析。数据以平均值±标准差(mean±SD)表示。采用单样本Kolmogorov-Smirnov检验分析数据的正态分布,Levene检验分析方差齐性,单因素方差分析(ANOVA)和Tukey多重检验来确定处理间的显著差异,最低显著水平为0.05($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 预测蛋白质抗原决定簇

经实验验证,大口黑鲈G6pc和Gck的全长蛋白均不能经IPTG在*E. coli* Rosetta细胞中被诱导表达(相关数据未展示)。根据G6pc和Gck蛋白的理化性质和三级结构预测其抗原决定簇(图1),选择靠近N端或C端且亲水性、抗原性、可塑性和表面可及性较高的氨基酸区域,将G6pc和Gck蛋白截短表达。G6pc截取第1—121个氨基酸,Gck截取第1—

459个氨基酸。

2.2 基因克隆与载体构建

以大口黑鲈肝组织的cDNA为模板, 采用表2中的引物序列, PCR扩增*g6pc*和*gck*基因片段。电泳检测结果如图2所示, *g6pc*和*gck*基因截短产物分别为380和1394 bp。*g6pc*和*gck*截短序列的重组质粒测序结果与NCBI收录的序列(登录号: ON246072和ON246073)一致, 表明原核表达载体pGEX-G6pc和pGEX-Gck构建成功。

2.3 表达和纯化重组蛋白

将pGEX-4T-3空载质粒及测序正确的pGEX-G6pc和pGEX-Gck重组质粒转化进感受态细胞并进行IPTG诱导表达和SDS-PAGE分析。结果发现, 与诱导前相比, pGEX-4T-3空载质粒经诱导后在26.3 kD处出现特异性条带(图3), 说明整个原核表达系统工作正常。截短的pGEX-G6pc和pGEX-Gck重组质粒经诱导后分别在40.2和77.6 kD处出现特异性条带, 表明目的蛋白被成功诱导表达。

将成功诱导表达的菌液超声破碎, 取上清和沉淀进行SDS-PAGE分析产物性质(图3)。结果显示, 截短的G6pc和Gck重组蛋白在上清液和包涵体沉淀中均大量存在, 因此使用GST-tag亲和层析的方式对上清液中的重组蛋白进行纯化。纯化后的G6pc

和Gck重组蛋白特异性条带明显且单一, 表明蛋白纯度较高。

2.4 鉴定重组蛋白

使用GST单克隆抗体进行Western blot鉴定显示, GST蛋白、G6pc重组蛋白和Gck重组蛋白分别在26.3、40.2和77.6 kD处被GST标签抗体特异性识别(图4), 证明纯化得到的重组蛋白为目标蛋白。

2.5 抗体特异性分析

将免疫小鼠后获得的多克隆抗体进行Western blot检测, 结果显示制备的G6pc和Gck抗体均能在26.3 kD处识别GST标签蛋白, 并在40.2和77.6 kD处识别对应的重组蛋白(图5)。此外, G6pc和Gck抗体分别在约41和54 kD处识别大口黑鲈肝组织蛋白, 这与预测的大口黑鲈G6pc和Gck蛋白大小吻合^[17], 证明制备的G6pc和Gck多克隆抗体能够特异性识别大口黑鲈内源性的G6pc和Gck蛋白。

2.6 抗体效价分析

按比例稀释制备的G6pc和Gck抗体, 对大口黑鲈肝组织蛋白(约80 μg)进行Western blot检测, 分析抗体效价。结果显示, G6pc抗体效价大于1:3000, Gck抗体效价大于1:10000(图6)。

2.7 G6pc和Gck的组织分布

使用制备的多克隆抗体检测大口黑鲈肝脏、

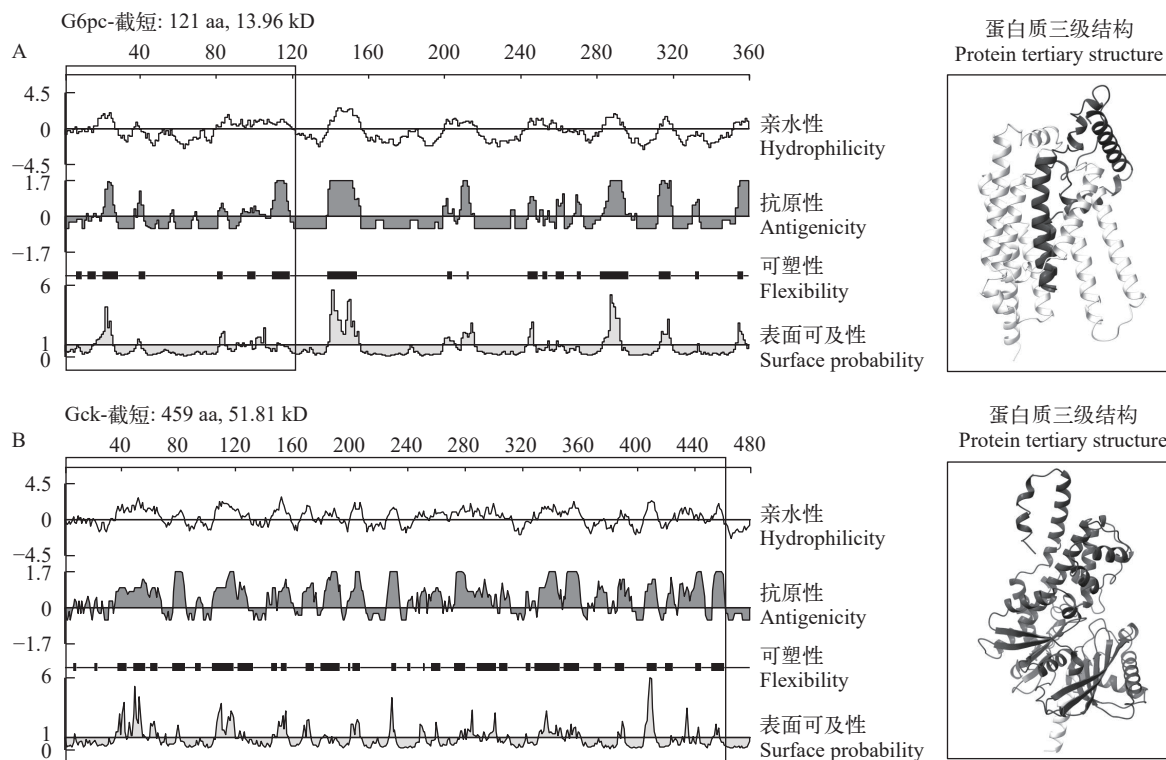


图1 大口黑鲈G6pc和Gck蛋白的理化性质和三级结构分析

Fig. 1 Physicochemical properties and structural analysis of deduced G6pc and Gck in largemouth bass

A. G6pc; B. Gck; 截短后蛋白的氨基酸序列由黑色方框标出, 三级结构由深色表示

A. G6pc; B. Gck; Black boxes indicate amino acid sequences of truncated proteins; Tertiary structures are indicated by dark colors

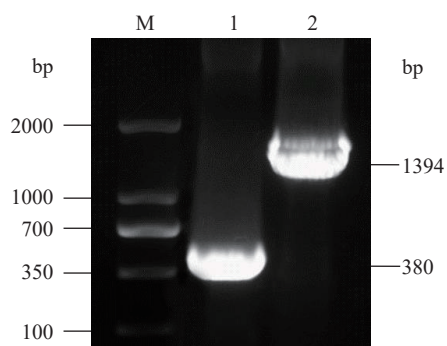


图2 *g6pc*和*gck*基因的PCR扩增产物电泳分析

Fig. 2 Electrophoretic analysis of PCR products for *g6pc* and *gck*
M. DNA分子量标准; 1. *g6pc*截短PCR产物; 2. *gck*截短PCR产物
M. DNA marker; 1. PCR product of truncated *g6pc*; 2. PCR product of truncated *gck*

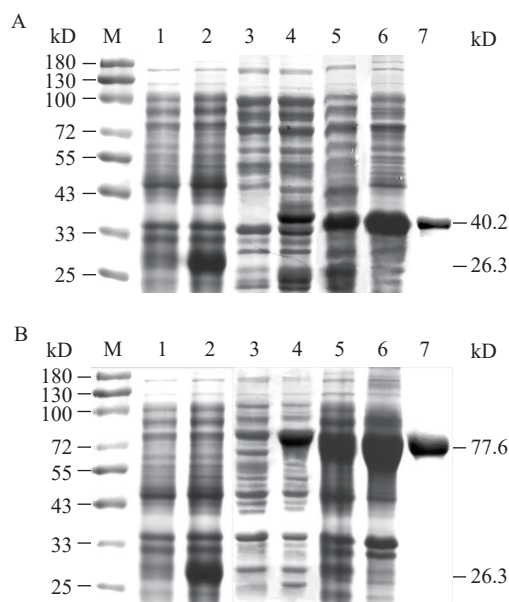


图3 G6pc和Gck重组蛋白表达和纯化产物的SDS-PAGE分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of G6pc and Gck recombinant protein expression and purified products

A. G6pc重组蛋白; B. Gck重组蛋白; M. 蛋白质分子量标准;
1. 未诱导空质粒; 2. 诱导后空质粒; 3. 未诱导截短重组质粒;
4. 诱导后截短重组质粒; 5. 破菌后沉淀; 6. 破菌后上清; 7. 纯化后重组蛋白

A. recombinant G6pc; B. recombinant Gck. M. protein marker;
1. uninduced empty plasmid; 2. induced empty plasmid; 3. uninduced truncated recombinant plasmid; 4. induced truncated recombinant plasmid; 5. precipitation after bacterial fragmentation; 6. supernatant after bacterial fragmentation; 7. purified target recombinant protein

心脏、肌肉和肠道组织中G6pc和Gck蛋白的表达水平, 结果显示, G6pc在肝脏中表达最高, 在肠道中有少量的表达; Gck亦在肝脏中表达最高, 心脏次之, 肠道中也有一定量的表达(图7)。

2.8 G6pc和Gck的亚细胞定位

免疫荧光染色结果显示, G6pc和Gck蛋白的荧

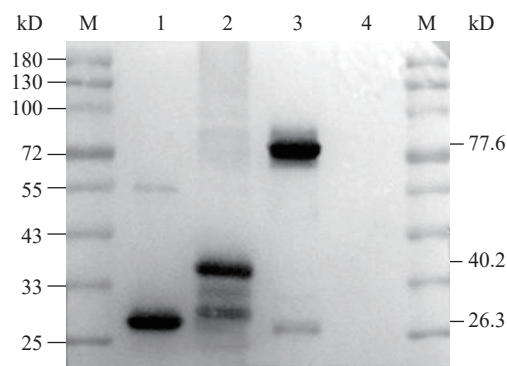


图4 Western blot鉴定G6pc和Gck重组蛋白

Fig. 4 Identification of G6pc and Gck recombinant proteins through Western blot

M. 蛋白质分子量标准; 1. GST标签蛋白; 2. G6pc重组蛋白;
3. Gck重组蛋白; 4. 肝组织蛋白

M. protein marker; 1. GST-tag protein; 2. recombinant G6pc protein; 3. recombinant Gck protein; 4. liver protein

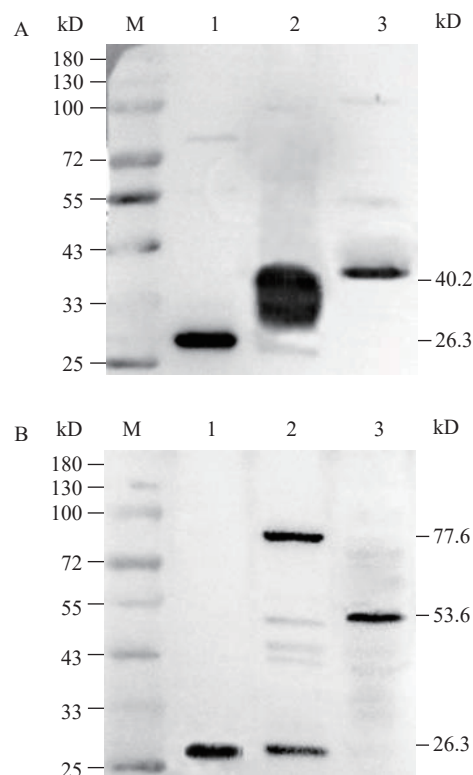


图5 G6pc和Gck多克隆抗体的特异性分析

Fig. 5 Specificity analysis of G6pc and Gck polyclonal antibodies
A. G6pc多克隆抗体; B. Gck多克隆抗体; M. 蛋白质分子量标准;
1. GST标签蛋白; 2. 重组蛋白; 3. 肝组织蛋白

A. G6pc polyclonal antibody; B. Gck polyclonal antibody. M. protein marker; 1. GST-tag protein; 2. recombinant protein; 3. liver protein

光信号均可在大口黑鲈肝组织切片中被检测到, G6pc荧光信号定位于细胞核周围, Gck荧光信号铺满整个细胞(图 8), 证明制备的G6pc和Gck多克隆抗体可用于免疫染色检测。

2.9 不同饲料淀粉水平下的糖代谢

饲料淀粉水平对大口黑鲈血糖、肝糖原含量、肝脏中糖代谢关键酶编码基因的转录及G6pc和Gck蛋白水平的影响如图 9所示。饲料淀粉水平(8%—20%)不显著影响禁食24h后大口黑鲈的血糖和肝脏中 $glut2$ 的表达($P>0.05$)。

随饲料淀粉水平以6%的梯度由8%增加至20%, 大口黑鲈肝脏中糖原含量、 gys 和糖酵解关键酶编码基因(gck 、 $pfkla$ 和 pk)的相对表达量及Gck蛋白水平均显著增加($P<0.05$)。S14组大口黑鲈肝脏中 $pygl$

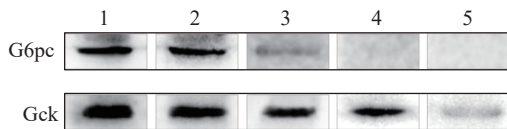


图 6 G6pc和Gck多克隆抗体的效价分析

Fig. 6 Titer analysis of G6pc and Gck polyclonal antibodies
稀释比例 Dilution ratio: 1. 1:1000; 2. 1:3000; 3. 1:5000; 4. 1:10000; 5. 1:50000

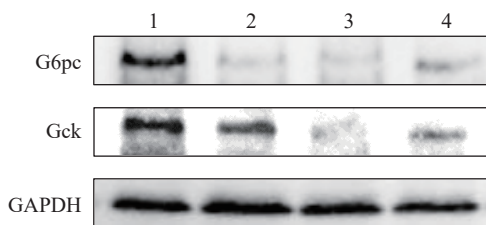


图 7 大口黑鲈G6pc和Gck蛋白的组织分布

Fig. 7 Tissue distribution of G6pc and Gck in largemouth bass
1. 肝脏liver; 2. 心脏heart; 3. 白肌white muscle; 4. 肠道intestine

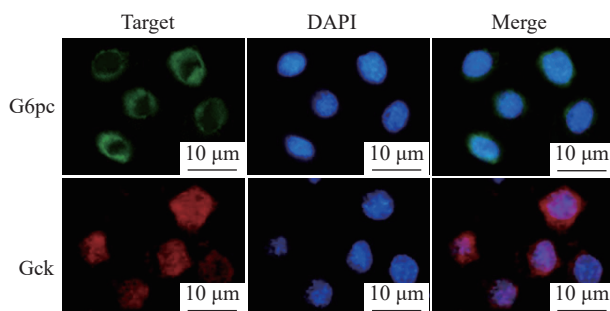


图 8 大口黑鲈肝组织G6pc和Gck蛋白的亚细胞定位

Fig. 8 Subcellular localization of G6pc and Gck in the liver of largemouth bass

绿色代表G6pc阳性信号, 红色代表Gck阳性信号, 蓝色代表细胞核

Green indicates G6pc positive staining, red indicates Gck positive staining, blue indicates nuclear staining

和糖异生关键酶编码基因($g6pca.1$ 、 $g6pca.2$ 和 $pepck$)的相对表达量及G6pc蛋白水平均显著低于S8和S20组。

3 讨论

3.1 G6pc和Gck的原核表达和抗体制备

G6Pase是糖异生和糖原分解途径共同的关键酶, GCK是糖酵解途径的关键酶, 它们在维持动物体的葡萄糖稳态中起着至关重要的作用。pGEX原核表达载体带有tac启动子、lac操纵子和GST标签蛋白等序列, 经IPTG诱导后可在大肠杆菌等原核表达系统中高效表达带GST标签的目的蛋白^[22], 目前已在草鱼^[23]、尼罗罗非鱼^[24]、团头鲂^[25]等多种鱼类中使用此载体进行体外表达。在本研究中, 将 $g6pc$ 和 gck 基因完整的CDS序列连接至pGEX载体并诱导表达后, 并未在表达产物中检测到重组蛋白, 这可能与目的蛋白中含有较高比例的疏水性片段有关。因此, 本研究根据G6pc和Gck蛋白的理化性质将其截短, 发现其可在1 mmol/L IPTG、16℃条件下被成功诱导表达, 并在破碎菌体后的沉淀和上

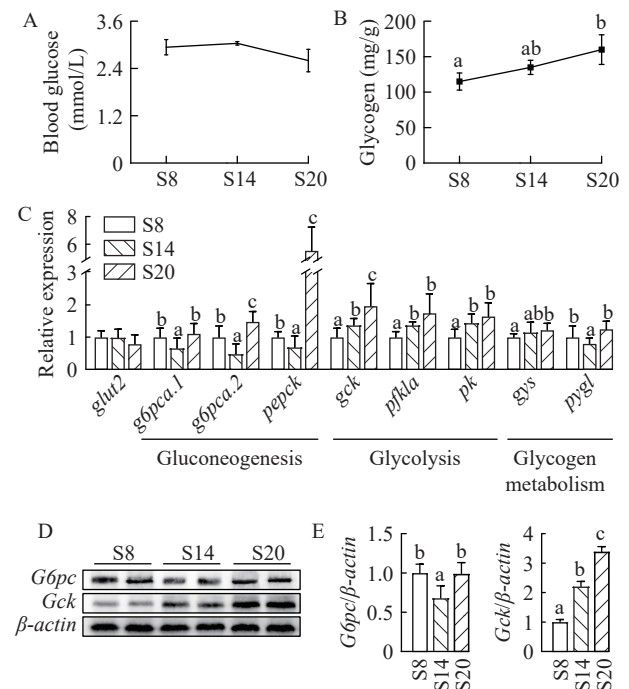


图 9 饲料淀粉水平对大口黑鲈糖代谢的影响

Fig. 9 Effects of dietary starch level on glycometabolism in LMB
A. 血糖水平; B. 肝糖原含量($n=3$); C. 基因表达($n=3$); D. 蛋白质免疫印迹($n=3$); E. 蛋白质免疫印迹量化分析; 数据以平均值 $\pm$ SD表示($n=3$); 不同字母代表不同处理之间存在显著差异

A. Blood glucose; B. Hepatic glycogen content ($n=3$); C. Gene expression ($n=3$); D. Western blot ($n=3$); E. Quantitative analysis of Western blot ($n=3$); Data are presented as means $\pm$ SD ($n=3$); Different letters indicate significant differences among treatments

清液中均大量存在。因沉淀中的重组蛋白受等电点、稳定性和蛋白折叠等因素影响以无活性的包涵体形式存在^[26, 27], 本研究通过GST-tag亲和层析对上清液中的重组蛋白进行纯化, 并以此对小鼠进行免疫, 成功制备出了大口黑鲈G6pc和Gck蛋白的多克隆抗体。

3.2 G6pc和Gck抗体的验证分析

多克隆抗体具有亲和性高、包容性强、结合力强等优点, 广泛应用于蛋白检测、蛋白互作和亚细胞定位研究等^[28]。在本研究中, 免疫小鼠5次后获得的抗血清不仅能够识别GST标签蛋白和对应的免疫原, 也能够特异性识别大口黑鲈肝组织中的G6pc和Gck蛋白, 且G6pc和Gck抗体按照1:3000和1:10000的比例稀释后仍能检测到明显、单一的条带。在本研究中, 采用G6pca.2截短蛋白制备的多克隆抗体除可识别G6pca.2外, 还可识别体外表达的G6pca.1截短蛋白(相关数据未展示), 因此可用于检测大口黑鲈肝组织中G6pc的总量。在哺乳动物中, G6PC定位于细胞内质网膜^[7], 而GCK在细胞质、细胞核和线粒体中均存在^[5]。免疫荧光染色显示, 大口黑鲈肝脏中G6pc的阳性信号亦位于细胞核周围, 而Gck荧光则散布整个细胞。与哺乳动物中报道的结果一致^[6, 29, 30], 大口黑鲈的G6pc和Gck亦主要分布于肝脏, 少量分布于肠道。此外, Gck在大口黑鲈心脏中也有较高的表达, 这可能与该组织具备一定的糖酵解能力有关^[31]。

3.3 饲料淀粉水平对G6pc和Gck表达的影响

肉食性鱼类的糖利用能力低下, 在投喂高糖饲料后往往表现出持续性高血糖现象^[15, 16, 32, 33]。在本研究中, 饲料淀粉水平(8%—20%)并不影响大口黑鲈的空腹血糖水平(2.60—3.04 mmol/L)及肝脏中*glut2*的表达量, 原因可能与取样时间(禁食24h)有关。苟仕潘等^[32]发现, 摄食饲料后(淀粉含量9%—18%), 大口黑鲈血糖峰值出现在餐后3—12h^[33]。因此, 在开展营养因子调控大口黑鲈葡萄糖稳态的后续研究中, 十分必要将取样时间由餐后24h前移至餐后6h左右。

在虹鳟中, 投喂高糖饲料会诱导肝脏中*gck*的表达, 但*g6pc*的表达不受影响甚至反而上调, 因而葡萄糖-G6P间相互转化的无效循环被认为是虹鳟葡萄糖不耐受的重要原因^[10, 34]。在大口黑鲈中, 现有研究表明投喂高淀粉饲料会诱导大口黑鲈肝脏中*gck*的表达, 但饲料淀粉水平是否影响*g6pc*的表达(不受影响或下调)尚无定论^[15—17]。与本课题组前期的研究结果一致^[17], 在本研究中随饲料淀粉从8%增加至14%, 大口黑鲈肝脏中*gck*的表达上调, 而

*g6pca.1*和*g6pca.2*的表达下调。当饲料淀粉水平进一步增加至20%时, 大口黑鲈肝脏中Gck的表达(mRNA和蛋白水平)进一步增加, 但*g6pc*的表达量和G6pc蛋白水平与8%淀粉组基本相当, 表明投喂高糖饲料可诱导大口黑鲈肝脏中Gck的表达, 但G6pc的表达是否受到抑制取决于饲料的淀粉水平。

葡萄糖-G6P间的循环以G6pc和Gck为关键节点酶, 涉及糖异生、糖酵解、糖原合成和糖原分解途径。除*g6pc*和*gck*的表达外, 本研究还测定了大口黑鲈肝脏糖酵解(*pfk*和*pk*)和糖异生途径(*pepck*)其他关键酶编码基因及糖原合成(*gys*)和糖原分解(*pygl*)关键酶编码基因的表达。研究结果显示, 随饲料淀粉水平由8%增加至20%, 大口黑鲈肝脏中糖酵解和糖原合成关键酶编码基因表达量逐渐升高, 但糖异生和糖原分解关键酶编码基因的转录仅在14%淀粉水平被抑制, 暗示在20%淀粉条件下大口黑鲈肝脏中出现了葡萄糖-G6P间转化的无效循环。在近乎相同的实验设计下, 肉食性牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)肝脏中糖代谢途径关键酶编码基因表达量的变化趋势与本研究基本一致^[35]。

综上所述, 本研究通过优化实验条件, 成功制备出高特异性和高效价的大口黑鲈G6pc和Gck多克隆抗体, 并检测了其组织分布和亚细胞定位。在此基础上, 探明了饲料淀粉水平对大口黑鲈肝脏中糖代谢关键酶编码基因的转录及G6pc和Gck蛋白水平的影响, 为深入研究G6pc和Gck在大口黑鲈葡萄糖稳态维持过程中的重要作用奠定了基础。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Hiriart M, Velasco M, Larqué C, *et al.* Metabolic syndrome and ionic channels in pancreatic beta cells [J]. *Vitamins and Hormones*, 2014(95): 87-114.
- [2] Nordlie R C, Foster J D, Lange A J. Regulation of glucose production by the liver [J]. *Annual Review of Nutrition*, 1999, 19(1): 379-406.
- [3] Li M V, Chen W, Harmanecy R N, *et al.* Glucose-6-phosphate mediates activation of the carbohydrate responsive binding protein (ChREBP) [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 395(3): 395-400.
- [4] Panserat S, Rideau N, Polakof S. Nutritional regulation of glucokinase: a cross-species story [J]. *Nutrition Research Reviews*, 2014, 27(1): 21-47.
- [5] Sternisha S M, Miller B G. Molecular and cellular regulation of human glucokinase [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019(663): 199-213.
- [6] van Schaftingen E, Gerin I. The glucose-6-phosphatase system [J]. *The Biochemical Journal*, 2002, 362(3): 513-532.
- [7] Hutton J C, O'Brien R M. Glucose-6-phosphatase

- catalytic subunit gene family [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, **284**(43): 29241-29245.
- [8] NRC (National Research Council). Nutrient Requirements of Fish and Shrimp [M]. National Academy Press, Washington, DC, 2011.
- [9] Panserat S, Capilla E, Gutierrez J, *et al.* Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2001, **128**(2): 275-283.
- [10] Skiba-Cassy S, Panserat S, Larquier M, *et al.* Apparent low ability of liver and muscle to adapt to variation of dietary carbohydrate: protein ratio in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *The British Journal of Nutrition*, 2013, **109**(8): 1359-1372.
- [11] Wang K W, Liu Q Q, Zhu J, *et al.* Transcriptome analysis provides insights into the molecular mechanism of liver inflammation and apoptosis in juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides* fed low protein high starch diets [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics & Proteomics*, 2023(45): 101047.
- [12] Ma H J, Mou M M, Pu D C, *et al.* Effect of dietary starch level on growth, metabolism enzyme and oxidative status of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides* [J]. *Aquaculture*, 2019(498): 482-487.
- [13] Liu Q Q, Xia R, Deng X, *et al.* Effects of dietary starch and metformin levels on the growth performance, body composition, hepatic glycolipid metabolism, and liver histology of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides* [J]. *Aquaculture*, 2023(573): 739582.
- [14] Lin S M, Shi C M, Mu M M, *et al.* Effect of high dietary starch levels on growth, hepatic glucose metabolism, oxidative status and immune response of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018(78): 121-126.
- [15] Li S, Sang C, Turchini G M, *et al.* Starch in aquafeeds: the benefits of a high amylose to amylopectin ratio and resistant starch content in diets for the carnivorous fish, largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *The British Journal of Nutrition*, 2020, **124**(11): 1145-1155.
- [16] Liu Y J, Liu N, Wang A, *et al.* Resveratrol inclusion alleviated high dietary carbohydrate induced glycogen deposition and immune response of largemouth bass, *Micropterus salmoides* [J]. *The British Journal of Nutrition*, 2022, **127**(2): 165-176.
- [17] Xia R, Liu H K, Liu X F, *et al.* Molecular cloning and tissue distribution of glucokinase and glucose-6-phosphatase catalytic subunit paralogs in largemouth bass *Micropterus salmoides*: Regulation by dietary starch levels and a glucose load [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2024(287): 111523.
- [18] Wang K W. Effect of protein and starch levels in diet on growth, feed utilization and liver health of largemouth bass *Micropterus salmoides* [D]. Chongqing: Southwest University, 2023: 18-19. [王康伟. 饲料蛋白和淀粉水平对大口黑鲈生长、饲料利用和肝脏健康的影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2023: 18-19.]
- [19] Ma D M, Fan J M, Tian Y Y, *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalisation in largemouth bass *Micropterus salmoides* fed on alternative diets [J]. *Journal of Fish Biology*, 2019, **95**(2): 393-400.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001(25): 402-408.
- [21] Tsuji Y. Transmembrane protein western blotting: Impact of sample preparation on detection of SLC11A2 (DMT1) and SLC40A1 (ferroportin) [J]. *PLoS One*, 2020, **15**(7): e0235563.
- [22] Tang Q L, Xu Q Z, Zhang L L, *et al.* Construction, expression and purification of pGEX-4T-3-MFGF21 [J]. *Biotechnology*, 2014, **24**(2): 18-24. [唐青蓝, 许庆忠, 张礼林, 等. pGEX-4T-3-MFGF21表达载体的构建、表达与纯化 [J]. 生物技术, 2014, **24**(2): 18-24.]
- [23] Wang H, Liu L, Ruan J M, *et al.* Molecular cloning, tissue expression and preparation of polyclonal antibody of *Pim-1* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2022, **44**(3): 670-678. [王辉, 刘林, 阮记明, 等. 草鱼 *Pim-1* 基因克隆、组织表达及多克隆抗体的制备 [J]. 江西农业大学学报, 2022, **44**(3): 670-678.]
- [24] Luo G L, Niu J Z, Huang Y, *et al.* Prokaryotic expression and condition optimization of *Galectin-3* gene in *Oreochromis* [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2019, **39**(4): 35-41. [罗国玲, 牛金中, 黄瑜, 等. 尼罗罗非鱼 *Galectin-3* 基因的原核表达与条件优化 [J]. 广东海洋大学学报, 2019, **39**(4): 35-41.]
- [25] Zhang J, Chen S S, He Y H, *et al.* Molecular cloning, sequence analysis and expression pattern of β -defensin 1 in *Megalobrama amblycephala* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2015, **34**(3): 97-103. [张涓, 陈思思, 何玉慧, 等. 团头鲂 β -防御素1基因cDNA的克隆、序列分析及表达特征 [J]. 华中农业大学学报, 2015, **34**(3): 97-103.]
- [26] Bao Y F, Ying L F, Jiang L. Research progress in renaturation of inclusion body protein [J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2012, **40**(2): 84-88. [包义凤, 应莲芳, 蒋琳. 包涵体蛋白复性技术研究进展 [J]. 微生物学免疫学进展, 2012, **40**(2): 84-88.]
- [27] Yan X R, Bao Y L, Dong X B, *et al.* Preparation of monoclonal antibody against recombinant GST and its application in purification of GST fusion protein [J]. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2001, **17**(4): 365-367. [严馨蕊, 鲍永利, 董学斌, 等. 抗重组GST单克隆抗体的制备及其在融合蛋白纯化中的应用 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, **17**(4): 365-367.]
- [28] Jin H, Li Y, Jiang N, *et al.* Identification and bioinformatics analysis of host cellular proteins interacting with PRRSV nsp11 [J]. *Microbiology China*, 2017, **44**(12): 2856-2870. [靳换, 李逸, 姜楠, 等. 与PRRSV nsp11互作的宿主细胞蛋白鉴定及生物信息学分析 [J]. 微生物学通报, 2017, **44**(12): 2856-2870.]

- [29] Printz R L, Magnuson M A, Granner D K. Mammalian glucokinase [J]. *Annual Review of Nutrition*, 1993, **13**(1): 463-496.
- [30] Guionie O, Clottes E, Stafford K, *et al.* Identification and characterisation of a new human glucose-6-phosphatase isoform [J]. *FEBS Letters*, 2003, **551**(1-3): 159-164.
- [31] Zhang L, Jain M K. Circadian regulation of cardiac metabolism [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2021, **131**(15): e148276.
- [32] Taj S, Li X J, Zhou Q C, *et al.* Insulin-mediated glycemic responses and glucose homeostasis in black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) fed different carbohydrate sources [J]. *Aquaculture*, 2021, **540**: 736726.
- [33] 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.]
- [34] Marandel L, Seiliez I, Véron V, *et al.* New insights into the nutritional regulation of gluconeogenesis in carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a gene duplication trail [J]. *Physiological Genomics*, 2015, **47**(7): 253-263.
- [35] Yang M X, Deng K Y, Pan M Z, *et al.* Molecular adaptations of glucose and lipid metabolism to different levels of dietary carbohydrates in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2020, **26**(2): 516-527.

PROKARYOTIC EXPRESSION, ANTIBODY PREPARATION, AND REGULATION BY DIETARY STARCH LEVELS OF G6PC AND GCK IN *MICROPTERUS SALMOIDES*

XIA Ru, SUN Hao, WANG Kang-Wei, MO Ding-Rui, HUANG Zheng, HE Yuan-Fa,
LIN Shi-Mei and CHEN Yong-Jun

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development (Ministry of Education), Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The dysregulation of glucose-G6P (glucose-6-phosphate) interconversion is thought to be an important reason for the low glucose tolerance of carnivorous fish. However, it remains unclear if this phenomenon applies to largemouth bass (*Micropterus salmoides*, LMB). To investigate the regulatory mechanism of glucose homeostasis influenced by nutritional factors in LMB, we cloned and constructed recombinant plasmid vectors containing truncated sequences of glucose-6-phosphatase catalytic subunit (*g6pc*) and glucokinase (*gck*). These recombinant plasmid vectors were transformed into *Escherichia coli* Rosetta receptor cells and successfully expressed using 1 mmol/L IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) induction overnight at 16°C. Following the lysis receptor cells, truncated G6pc, and Gck recombinant proteins were purified by GST-tag affinity chromatography from the supernatants. The purified recombinant proteins were emulsified with Freund's adjuvant to create immunogens, and immunized to KM mice for five times. G6pc and Gck polyclonal antibodies with high specificity were successfully prepared with titers exceeding 1:3000 and 1:10000, respectively. Western blot analysis showed that both G6pc and Gck in LMB were mainly distributed in the liver. Immunofluorescent staining indicated that the G6pc positive signals were localized around the nucleus, whereas Gck positive signals spread throughout the hepatocytes. After an 8-weeks feeding trial, the results showed that Gck level and the expression of genes involved in glycolysis and glycogenesis in the liver of LMB increased gradually with dietary starch levels rising from 8% to 20% in 6% increments. Conversely, G6pc levels and the expression of genes involved in gluconeogenesis and glycogenolysis were only down-regulated at 14% starch. These results suggested that a high starch diet (20%) could induce a futile cycle of glucose-G6P interconversion in the liver of LMB. In summary, specific polyclonal antibodies of G6pc and Gck were successfully prepared in LMB, and the regulation of their expression by dietary starch levels was evaluated in this study. This research lays the foundation for further elucidating the roles of G6pc and Gck in the glucose homeostasis of LMB.

Key words: G6Pase; Glucokinase; Prokaryotic expression; Polyclonal antibody; *Micropterus salmoides*