

doi: 10.12131/20180264

斑节对虾 *GLUT1* 基因 cDNA 的克隆与表达分析

何 鹏^{1,2}, 江世贵³, 李运东³, 杨其彬³, 姜 松^{1,3},
杨丽诗³, 黄建华¹, 周发林¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所深圳试验基地, 广东 深圳 518121; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 3. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300)

摘要: 该研究利用 RACE 技术克隆获得了斑节对虾 (*Penaeus monodon*) *GLUT1* (glucose transporter type 1) 的 cDNA 全长序列; 采用实时荧光定量的方法研究了 *PmGLUT1* 在斑节对虾幼体发育过程中、各个组织中及低盐胁迫下的差异表达情况。该基因 cDNA 开放阅读框 (ORF) 全长 1 476 bp, 可编码 491 个氨基酸。检测 *PmGLUT1* 基因从受精卵至仔虾期发育过程的表达情况, 结果显示, *PmGLUT1* 在幼体发育各期的表达量有所波动, 但总体呈现上升趋势。组织表达分析发现, *PmGLUT1* 在鳃组织中的表达量最高, 肝胰腺次之, 在卵巢中的表达量最低。急性低盐胁迫后, *PmGLUT1* 在肝胰腺中的表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 但在鳃中的表达水平显著低于对照组 ($P < 0.05$)。研究结果表明, *PmGLUT1* 可能在斑节对虾幼体发育及机体应对低盐胁迫过程中具有重要作用, 这为进一步研究葡萄糖转运蛋白基因在斑节对虾幼体发育调控和耐低盐胁迫应答中的分子机制提供了理论依据。

关键词: 斑节对虾; *GLUT1*; 基因克隆; 幼体发育; 低盐胁迫

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

文章编号: 2095 - 0780 - (2019) 02 - 0072 - 11

Molecular cloning and expression pattern analysis of *GLUT1* in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

HE Peng^{1,2}, JIANG Shigui³, LI Yundong³, YANG Qibin³, JIANG Song^{1,3},
YANG Lishi³, HUANG Jianhua¹, ZHOU Falin¹

(1. Shenzhen Base of South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shenzhen 518121, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: We obtained the full-length cDNA sequence of *GLUT1* from *Penaeus monodon* by rapid amplification of cDNA ends (RACE), and investigated the expression of *GLUT1* at different larval developmental stages, in different tissues, and under low salinity stress by quantitative real-time PCR. The total cDNA sequence of *PmGLUT1* open reading frame (ORF) was 1 476 bp, encoding 491 amino acids. From zygote to postlarva stages, the expression of *PmGLUT1* fluctuated but showed an increasing trend. The *PmGLUT1* was expressed in all tested tissues with the highest expression in gill tissue, followed by hepatopancreas, and the lowest expression was in ovary. After acute low salinity stress, the expression level of *PmGLUT1* mRNA in hepatopancreas was significantly

收稿日期: 2018-11-28; 修回日期: 2019-01-03

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-48); 深圳市现代农业和海洋生物产业扶持计划 (生物产业类) (20170428152352908); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项 (A201701A01)

作者简介: 何 鹏 (1993—), 男, 硕士研究生, 从事水产动物遗传育种与分子生物学研究。E-mail: hepeng_bryan@outlook.com

通信作者: 周发林 (1975—), 男, 博士, 研究员, 从事水产动物遗传育种与分子生物学研究。E-mail: zhoufalin@aliyun.com

higher than that in the control group, while the expression level in gill was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The results show that *PmGLUT1* might play an important role at different larval developmental stages and under low salinity stress, which provides a theoretical basis for studying the molecular mechanism of *PmGLUT1* in larval development and salinity adaptation of *P. monodon*.

Key words: *Penaeus monodon*; *GLUT1*; gene cloning; larval development; low salinity stress

葡萄糖是生物体内的重要能源物质, 葡萄糖转运蛋白 (glucose transporters, GLUTs) 是协助转运葡萄糖等小分子碳水化合物的一类重要膜蛋白, 是细胞获得葡萄糖的基础需求, 对维持生物体的正常代谢至关重要^[1-3]。有研究表明, 在环境刺激下, 机会会调节 GLUT1 的水平来维持血糖供应^[4-5]。当斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 处于盐度胁迫的时候, 可能需要调节 GLUT1 的水平来调节血糖, 维持内环境稳态。因此, 开展 *GLUT1* 基因的功能研究, 对阐明其在盐度胁迫过程中的作用机理很有必要。

关于 *GLUT1* 基因在水产动物中的研究已取得了一些进展。任鸣春^[6]研究了饲料中糖分对军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) *GLUT1* 基因的表达影响; Balmaceda-Aguilera 等^[7]克隆了金头鲷 (*Sparus aurata*) *GLUT1* 基因, 并分析了其在不同盐度下的应激表达, 发现该基因在高盐度及低盐度下表达量较高; Martinez-Quintana 等^[8]分析了凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) *GLUT1* 的二级结构、基因组结构及其在缺氧情况下的基因表达情况; Wang 等^[9]研究了日粮中添加不同水平糖类及盐度胁迫下凡纳滨对虾 *GLUT1* 基因在各组织中的表达情况, 发现该基因在第 96 小时盐度胁迫过程中更活跃。在水产动物中, 对于 *GLUT1* 基因的研究还涉及到长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 和企鹅珍珠贝 (*Pteria penquin*) 等物种^[5,10-11], 而尚未见斑节对虾中该基因的报道。

在人工养殖过程中, 盐度是影响斑节对虾生理代谢的重要环境因子, 影响其渗透调节、免疫防御、呼吸代谢等生理功能, 在低盐胁迫下斑节对虾的生长发育和存活都受到影响^[12-13]。本研究利用 RACE 技术基于斑节对虾转录组获得的 *GLUT1* 基因 EST 序列克隆得到了该基因的 cDNA 全长, 分析了其在斑节对虾幼体发育过程中、各个组织中及低盐胁迫下的表达模式, 以期对斑节对虾盐度胁迫应答分子调控机制的剖析提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

斑节对虾取自中国水产科学研究院南海水产研究所深圳试验基地。于 2017 年 7 月 20 日选取体长为 7~10 cm、体质量为 8~12 g 的对虾暂养于自然海水的水泥池 (4.71 m×4.13 m×1.73 m, 养殖水体体积为 5.84 m³) 1 周, 并充分曝气, 养殖温度为 25~28 ℃。1 周后, 随机选取健康完整的雌雄对虾各 3 尾, 分别取其肝胰腺、鳃、心脏、肠、胃、淋巴、肌肉、眼柄神经、卵巢、精巢等组织样品, 来自 3 尾虾的同类样品混合成一管。在深圳试验基地斑节对虾夏季繁育过程中采集其幼体发育各期的样品 (取 3 组平行样品), 包括受精卵 (Z)、无节幼体 (N)、蚤状幼体 I 期 (Z₁)、蚤状幼体 II 期 (Z₂)、蚤状幼体 III 期 (Z₃)、糠虾幼体 I 期 (M₁)、糠虾幼体 II 期 (M₂)、糠虾幼体 III 期 (M₃)、仔虾期 (P)。斑节对虾幼体发育分期参照《斑节对虾种虾繁育技术》^[14]。样品置于 RNAlater Solution (Ambion, 上海) 中 4 ℃ 保存过夜后置于 -80 ℃ 保存。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 的制备 按照 HiPure Fibrous RNA Plus Kit (Megan, 中国) 试剂盒说明书提取上述样品的总 RNA。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, NanoDrop 2000 检测其浓度。进行荧光定量的样品按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书进行反转录, 得到的 cDNA 用 EF 引物检测后, -80 ℃ 保存备用。由肝胰腺、肌肉的混合样品分别按照 HiPure Tissue DNA Mini Kit 试剂盒说明书和 Prime Script II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书制备克隆的模板 cDNA 及用于 RACE 的模板 cDNA。

1.2.2 *PmGLUT1* 的 cDNA 克隆 从斑节对虾转录组文库中获得 EST 序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物 *GLUT1*-F、*GLUT1*-R (表 1), 引物由北京睿博兴科生物技术有限公司广州分公司合成, 使用 Ex Taq 酶 (TaKaRa, 中国), 以获得的

表1 实验中所用引物序列

Tab.1 Oligonucleotide primers used in this experiment

引物 primer	引物序列 (5'-3') primer sequence	用途 function
GLUT1-F	ATGGCTTATTCGGGTTAACGT	cDNA序列验证
GLUT1-R	TTATAGTTGGCCTCCTCTTTGG	
GLUT1-3'GSP1	ATGATTGGTGGTTTCTGCGGTGGC	3'RACE
GLUT1-3'GSP2	CTCTCAACCTGCGTGGTGGGCTG	
GLUT1-5'GSP1	CCAGACCCGCAGCCGTGAATAGG	5'RACE
GLUT1-5'GSP2	CTACTATGCCACCGCAGAAACCACC	
GLUT1-qPCR-F	CTTCTTGTTACGCCATCTTC	real-time RT-PCR
GLUT1-qPCR-R	TGCTGCCTCAATGTTCT	
EF-1 α -qPCR-F	AAGCCAGGTATGTTGTCAACTTT	real-time RT-PCR
EF-1 α -qPCR-R	CGTGGTGCATCTCCACAGACT	

cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系参照邱莹等^[5]。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。胶回收目的条带并与 pMD19-T 载体 (TaKaRa, 中国) 连接 1 h, 然后转入大肠杆菌感受态细胞中, 将转化后的大肠杆菌感受态细胞均匀涂到 LA 培养基上, 37 °C 培养箱培养 8~12 h 后挑取 8 个阳性克隆, 经菌液 PCR 判定后送往赛默飞世尔科技有限公司 (中国) 测序。将测序结果与获得的 EST 序列比对验证。

利用 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 技术、降落 PCR 技术、半巢式 PCR (semi-nest) 技术扩增目的基因的 3'末端。实验中降落 PCR 引物使用 GLUT1-3'GSP1 和接头通用引物 UPM (表 1), 反应条件为 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 75 °C 30 s, 72 °C 90 s, 10 个循环; 94 °C 30 s, 66 °C 30 s, 72 °C 90 s, 25 个循环; 72 °C 10 min。取 5 μ L 降落 PCR 产物, 稀释 50 倍后取 2 μ L 用于巢式 PCR, 引物使用 GLUT1-3'GSP2 和接头通用引物 NUP, 反应条件为 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。目的基因的 5'末端扩增与上述方法一致。巢式 PCR 产物与验证目的基因 PCR 产物相同处理, 最后将测序结果与目的基因比对, 获得葡萄糖转运蛋白基因的 cDNA 全长。

1.2.3 *PmGLUT1* 的生物信息学分析 利用 DNA-man 软件对测序序列进行拼接, 获得 *PmGLUT1* 基

因全长。利用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 查找开放阅读框。利用 EMBOSS (<http://www.bioinformatics.nl/emboss-explorer/>) 预测氨基酸序列。利用 NCBI 中 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 工具对预测的氨基酸序列与蛋白质数据库进行相似性比对分析。利用 Clustal X 软件进行多重序列比对。利用 ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 统计各种氨基酸含量、预测等电点和理论分子质量。利用 SMART 4.0 (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1) 进行蛋白结构域分析。利用 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测糖基化位点。利用 NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测磷酸化位点。三级结构预测利用 SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>), 构建系统进化树利用 Clustal X 和 MEGA 6.0 软件。

1.2.4 *PmGLUT1* 幼体发育各期的表达分析 利用 Beacon Designer 7.0 软件设计用于 *PmGLUT1* 幼体发育各期表达分析的荧光定量引物 GLUT1-qPCR-F/R (表 1), 内参基因使用 *EF-1 α* (elongation factor 1 α)^[15]。以斑节对虾幼体发育各期的 cDNA 为模板, 利用 Roche LightCycler[®] 480II (Roche, Germany) 进行实时荧光定量 RT-PCR 扩增。反应体系为 12.5 μ L, 包括 5.25 μ L TB Green[™] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus), 0.5 μ L 上下游引物, 1 μ L

模板 cDNA (约 40 ng), ddH₂O 补足至 12.5 μ L, 每个样品设 3 个重复和内参对照, 并设置阴性和阳性对照, 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 5 s, 45 个循环; 65 $^{\circ}$ C 15 s; 55 $^{\circ}$ C 升至 97 $^{\circ}$ C; 37 $^{\circ}$ C 5 min。

1.2.5 *PmGLUT1* 的组织表达分析及低盐胁迫下的表达分析 低盐胁迫实验于中国水产科学研究院南海水产研究所深圳试验基地开展, 选取 7~10 cm 的对虾 280 尾为实验材料。首先进行预实验以确定本次实验所用的盐度胁迫浓度。急性预实验共设计 6 个浓度梯度, 即盐度 30、盐度 10、盐度 5、盐度 3、盐度 1、淡水, 每个梯度一个 500 L 塑料桶, 每个桶加入 300 L 不同盐度的海水, 40 尾虾。在 96 h 实验期间每 2 h 捞取每个梯度的死虾, 并做好记录。另设计一组缓降预实验, 在一个 500 L 塑料桶中加入 300 L 盐度 30 的养殖海水, 40 尾虾, 每 24 h 盐度降低 5, 降至盐度 5 时依次每 24 h 后降为盐度 3、盐度 2、盐度 1。由盐度 5 降至盐度 1 是为了探索斑节对虾在盐度缓降过程中的低盐耐受性。实验中的盐度浓度由养殖用的海水与淡水混合, 并利用盐度计 (AZ8371, 台湾衡欣) 调节到目标盐度。预实验的目的是探索斑节对虾在各盐度下的存活情况。结果表明, 盐度 3 为 96 h 实验的半致死盐度。

根据预实验的结果, 将正式实验分为 2 个。第一个急性实验设计 2 组, 分别为盐度 30 (对照组) 和盐度 3 (实验组)。每组设 3 个平行, 每个平行 1 个桶, 并在其中加入 300 L 不同盐度的海水, 各放 40 尾虾, 养殖温度为 25~28 $^{\circ}$ C, pH 为 7.0 \pm 0.5。实验期间每 3 h 捞取每个塑料桶的死虾, 并做好记录; 在对照组桶中选取 3 尾活力较好处于蜕皮间期的个体, 分别取其鳃组织和肝胰腺组织, 将同类组织混合均匀保存于 RNAlater Solution 中; 分别于第 3、第 6、第 12、第 24、第 48、第 72、第 96 小时在盐度 3 的塑料桶中选取 3 尾活力较好处于蜕皮间期的个体, 取与对照组相同的组织混合均匀保存于 RNAlater Solution 中, 4 $^{\circ}$ C 过夜后保存于 -80 $^{\circ}$ C。第二个缓降实验设计 1 组, 3 个平行, 实验处理及实验条件与预实验相同, 在每次盐度缓降之前取样。

按前述方法分别抽提斑节对虾各组织及盐度胁迫各时间点样品的总 RNA, 逆转录合成 cDNA。

取各稀释后的 cDNA 为模板, *EF-1 α* 为内参进行实时荧光定量 RT-PCR 扩增。扩增方法同上述幼体发育各期的表达。实时荧光定量 PCR 数据使用相对 CT 法 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 进行分析, 利用统计学分析软件 SPSS 24.0 对实验结果进行单因素方差 (One-Way ANOVA) 分析, 并计算差异显著性, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 *PmGLUT1* 序列分析

通过克隆获得斑节对虾葡萄糖转运蛋白 cDNA 全长, GenBank 登录号为 MH190406。*PmGLUT1* 全长 2 023 bp (图 1), 5'非编码区 (UTR) 276 bp, 3' UTR 271 bp, 包括 23 个碱基的 poly(A) 尾, 开放阅读框 (ORF) 1 476 bp, 可编码 491 个氨基酸 (图 1), 其中包括 37 个强酸性氨基酸 (Asp+Glu) 和 36 个强碱性氨基酸 (Arg+Lys)。ExPASy Prot-Param 预测其分子量为 54.179 kD, 理论等电点为 6.39; 预测不稳定指数 (II) 为 48.87, 提示该蛋白不稳定; 亲水性平均值 (GRAVY) 为 0.457, 说明该蛋白为疏水蛋白; 脂肪指数为 107.82, 说明该蛋白具有较高的耐热性。*PmGLUT1* 有多种功能位点, 包括 1 个糖基化位点、5 个 CK II (酪蛋白激酶 2) 磷酸化位点、6 个 PKA (cAMP 依赖蛋白激酶 A) 磷酸化位点、6 个 PKC (蛋白激酶 C) 磷酸化位点、15 个 unsp (非特异性蛋白修饰) 磷酸化位点。预测 *PmGLUT1* 存在 12 个跨膜结构域。序列含有一个 MFS (major facilitator superfamily) 功能结构域, 位于 13~456 aa。利用 SOPMA 法对其二级结构预测后得知, 其二级结构由 α 螺旋、延伸链、 β 折叠和无规则卷曲构成, 其中包含 256 个 α 螺旋, 占 52.14%; 81 个延伸链, 占 16.50%; 25 个 β 折叠, 占 5.09%; 129 个无规则卷曲, 占 26.27%。利用 SWISS-MODEL 构建了该蛋白的三维结构, 其三维结构与黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) *GLUT1* 的三维结构较相近, 同源性达 72% (图 2)。

将 *PmGLUT1* 的氨基酸序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对, 发现其与其他生物的 *GLUT1* 氨基酸序列具有较高的同源性。利用 Clustal X 软件将 NCBI 上检索到的其他物种的 *GLUT1* 氨基酸序列进行多重序列比对, 结果发现, 不同物种间的 *GLUT1* 较为保守 (图 3), 其中 *PmGLUT1* 与凡纳滨对虾


```

1  GTCTAGCTGTCTGTGCCCGGGTGTGACGCGCTGCTGTGCTTCTGGTCTGTGAATGGATATTTTAAAAAATACCTCAGGGATGAAT 90
91  ACITTTGTTAGCGTGTATTTTTTCCGTAGATCTTTTGGATTGAGTCCTGTGTTTTAACACCAAGGACGTACATATCTCCGACGGATCG 180
181  TCGTCATAGCTCAAAAAGAGGGCGCGCCACGGTAGTGTAGAAGCCCTATCAACCCGAAAGTAGCTACAACAACCAGCACTCTTGTTGG 270
271  TCCATCAtggcttattcgggttaacgtgcttctgtgttacgccatcttcgctgtgcttggaaatgttccagtttggctacaacact 360
1  M A Y S G L T C F L C Y A I F A A V L G M F Q F G Y N T 28
361  ggggttatcaatgctccacaatctgttattgagaacttcatgttgactgctggaaggaacggtacaacaggaacatgaagcgcaag 450
29  G V I N A P Q S V I E N F I G D C W K E R Y N R N I E G S K 58
451  caggatttgatattggctattgccgtaicttcttcgctataggtggaatgattgggttcttcgggtggcatagtaggaaacaggttt 540
59  Q D L I W S I A V S I F A I G G M I G G F C G G I V G N R F 88
541  ggcagaagaaggccttactcctaacaacaccttttgggagtgaggagcatgtctcatgggcttctcctcaaatgttatactcttttgag 630
89  G R K K G L L L N N L L G V G G A C L M G F S Q M L Y S F E 118
631  atgctcactccttagtagattggctcattggcatttaactcgggtttgaaacacctcgttagttcccatgtacatcagatgagatcgccctctc 720
119  M L I L G R L V I L G I N C G L N T S L G V P M Y I S E I A P L 148
721  aacctcgtgggtgggtaaccgtcaaccaattggcgtgcacagctgctcctcctcacaggttcttggcattgagcaactctt 810
149  N L R G G L G T V N Q L A V T V G L L L S Q V L G I E Q L L 178
811  gggaaatgcaatgctggcctcttctccttaggtcttgccattgtccagctgtgatgcagatggctgctgcccagtggttcagaaatct 900
179  G N S N A W P L L L G L A I V P A V M Q M V L L P V C P E S 208
901  ccacgctacttgctcactcagccagttagaggatggaagcgaagagccttaaggagactgcgtgcatcaagtcattgtaggaagat 990
209  P R Y L L M S R Q L E D E A R R A L R R L R A S S H V E E D 238
991  atcgaagagatgagcagcaggaagcagcagccagactgaagctcacatgagatattgttcagctggtgctgatcatcgccactgcccag 1080
239  I E E M R A E E A A S Q T E A H M S M L Q L V R S S A L R M 268
1081  ccactcaaatggcattgttatgcagcctcctccagcagttgctgagcatttaactgagcgtgctgcttactcaacatccctattcagcgct 1170
269  P L T I G I V M Q L S Q Q L S G I N A V L Y Y S T S L F T A 298
1171  ggggttggaaatggcagtcacaagtatgctactcttggcggtgggtcggtgatgggttatcatgacctgggtgctcctctctcctatg 1260
299  A G L E E W Q S K Y A T L G V G S V M V I M T L V S I P L M 328
1261  gatcagccggcagctacgcttaccctgtatggctcgggtggaatgtttgcttctcctcttatacactattagcttcccttattag 1350
329  D R A G R R T L H L Y G L G G M F V F R S L F I T I S L L I K 358
1351  gaaatgatgtcatggatgacctttatctctgtgataagcacccttgcctcgtcactcttcttctctgtgggtcctggcagttatccatgg 1440
359  E M M S W M T F I S V I S T L C F V I F F S V G P G S I P W 388
1441  atgatcacagctgaactcttctcccaggcccgctccagctccaatgtccattgtctgttctagttaatggctgtctaatctcctgttt 1530
389  M I T A E L F S Q G P R P A A M S I A V L V N W L S N F L V 418
1531  ggaatcgggtttccaaaaatgcaggaggcatttgaaaactacaccttttggcatttagtgcctactcgcgtgcttctgggtgtttaca 1620
419  G I G F P K M Q E A F E N Y T F L P F S V L L A C F W V F T 448
1621  tactacaagtgccagagaccaagaataagaccttgaagaatctctgcaatcttccaagagggggtgacagagaggagaagcggaac 1710
449  Y Y K V P E T K N K T F E E I S A I F Q R G V D R E E K R N 478
1711  acggaagtagggccagatgccaaagaggagccaactataaACATGCAGAACCTTATCTTGTAGATGACTATGCACAAGCATCTGT 1800
489  T E V G P D A K E E A K L * 491
1801  TAGGTTTAAAGTAAAGTTATATTAGTTAATTTTACAGTTAAAAAGAAAATGTGATGATTTTTTTATTATGTTAGAATATATA 1890
1891  CAAATTTGTCATGGTAATTTTTTTCAGATGAAAGGTTTACGTTAGATTTTATTAACAATGTATGTTTATGTTTGAACAGTGTCTTTAA 1980
1981  TAGTGATTATAAGTACCATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2 023

```

图1 PmGLUT1基因的氨基酸序列及cDNA全长

下划线表示起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA);方框表示MFS超家族结构域;斜体表示Poly A尾巴

Fig.1 Amino acid and nucleotide sequences of PmGLUT1

Initiation codon (ATG) and termination codon (TAA) are underlined; MFS structural domain is shown in box; the poly A signal sequence is italicized.

(*Litopenaeus vannamei*, AIT97017.1) 同源性最高(99%), 与美洲收获蚁(*Pogonomyrmex barbatus*, XP_025073756.1)、北方粗切叶蚁(*Trachymyrmex septentrionalis*, KYN32497.1) 和哥伦比亚美洲切叶蚁(*Atta colombica*, KYM89830.1) 一致性为74%, 与佛罗里达弓背蚁(*Camponotus floridanus*, XP_019882023.2)、寄生蚂蚁(*Pseudomyrmex gracilis*, XP_020292929.1)、兰花蜜蜂(*Eufriesea mexicana*, OAD58536.1)、回条蜂(*Habropoda laboriosa*, KOC67429.1)、黑蚁(*Lasius niger*, KMQ91266.1) 的相似度为73%, 与顶切叶蚁(*Acromyrmex echinatio*, EGI61918.1)、黑腹果蝇(NP_001261237.1) 和欧洲熊蜂(*Bombus terrestris*, XP_012166043.1) 的同源性为72% (图3)。利用MEGA 6.06软件, 基

于NJ (neighbor-joining) 法采用Bootstrap method 重复计算1000次构建了PmGLUT1和其他物种的系统进化树(图4)。无脊椎动物和脊椎动物的GLUT1被明显区分出来。其中斑节对虾的GLUT1和与其相似性最高的凡纳滨对虾独立聚为一支, 之后与其他节肢动物聚类。

2.2 PmGLUT1在发育各期的表达

PmGLUT1在斑节对虾幼体发育各期的表达情况见图5。从受精卵到仔虾期, PmGLUT1的表达量逐渐上升, 虽然在无节幼体期、溞状幼体III期、糠虾幼体II期的表达量较前一时期有所下降, 但随着斑节对虾的幼体发育, PmGLUT1的表达量整体呈上升趋势。且PmGLUT1在糠虾幼体I期后的表达量与在受精卵中的表达量相比差异显著(P<0.05)。

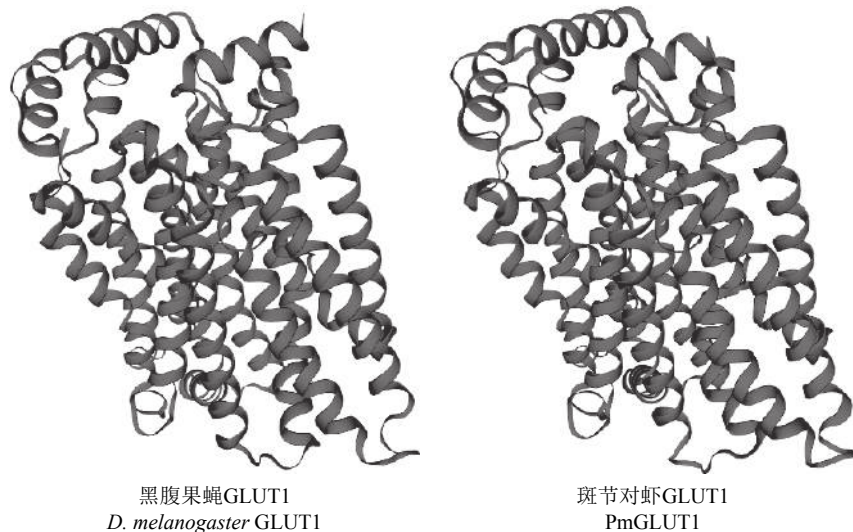


图2 黑腹果蝇GLUT1与斑节对虾GLUT1三维结构空间示意图

Fig.2 Three-dimensional ribbon structure of *D. melanogaster* GLUT1 and *P. monodon* GLUT1

2.3 *PmGLUT1* 在不同组织中的表达

选择 *EF-1 α* 作为内参, 利用 qRT-PCR 技术对 *PmGLUT1* 在斑节对虾各组织中的表达进行检测。*PmGLUT1* 在斑节对虾的各组织中均有表达 (图 6), 在鳃组织中表达量最高, 约是淋巴中表达量的 5.8 倍, 其次在肝胰腺表达量较高, 约是淋巴中表达量的 4 倍, 而在肌肉、精巢以及卵巢中的表达量较低, 分别仅约为淋巴中表达量的 1/6、1/14 和 1/23。

2.4 *PmGLUT1* 在低盐胁迫下的表达

基于 *PmGLUT1* 在不同组织中的相对表达量, 研究 *PmGLUT1* 在盐度胁迫各时期肝胰腺和鳃组织中相对表达量的变化。在盐度急性胁迫组实验中, *PmGLUT1* 在肝胰腺和鳃组织中的表达情况见图 7, *PmGLUT1* 在肝胰腺中的表达量在第 3 小时明显下降, 与对照组差异显著 ($P < 0.05$), 第 6 小时仍维持较低的表达量, 第 12 小时表达量上升, 与对照组无显著差异, 随后表达量又逐渐降低, 第 48 小时后表达量明显回升, 并在第 96 小时达到高峰, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$); 而 *PmGLUT1* 在鳃组织中的表达量从盐度胁迫开始呈下降趋势, 第 24 小时表达量有所上升, 随后又逐渐下降, 第 96 小时表达量最低, 与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。

在盐度缓降胁迫组中, *PmGLUT1* 在肝胰腺和鳃组织中的表达情况见图 8。当盐度下降 5 后, *PmGLUT1* 在肝胰腺中的表达量迅速上升达到峰

值, 显著高于对照组 ($P < 0.05$); 在盐度 20 时表达量下降, 然后在盐度 15 时有一个明显的回升, 随后又逐渐下降; 盐度降至 1 时表达量明显上升, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。当盐度下降 5 后, *PmGLUT1* 在鳃组织中的表达量上升, 但与对照组相比无显著性差异; 随后表达量逐渐降低, 在盐度 5 时, 表达量迅速上升达到峰值; 在盐度 3 时有一个回落后表达量升高; 盐度降至 1 时, 表达量高于对照组, 但无显著差异。

3 讨论

本研究成功克隆了斑节对虾 *GLUT1* 基因, 通过氨基酸序列分析表明其有 12 个跨膜结构域, N 端与 C 端都位于质膜侧, 且具有 MFS 功能结构域, 属于 MFS 基因家族。经多重比对发现, *PmGLUT1* 与其他物种的 *GLUT1* 具有较高的相似性, 与凡纳滨对虾 *GLUT1* 的同源性最高 (99%), 说明 *GLUT1* 在不同物种间较为保守。

PmGLUT1 在斑节对虾幼体发育过程中, 表达量从受精卵到无节幼体期略有下降, 但差异不显著, 这可能与无节幼体是通过消耗卵黄提供能量有关。从蚤状幼体期至仔虾期 *PmGLUT1* 的表达量虽有波动, 但呈逐渐上升趋势。这可能是由于幼体发育较快, 不断地变态、蜕皮生长, 新陈代谢越来越强, 需要更多的能量供应。吴勉之等^[16] 研究发现了 2 种高血糖激素基因与幼体发育的能量代谢有关, 当幼体处于变态发育的关键时期时, 能量代谢

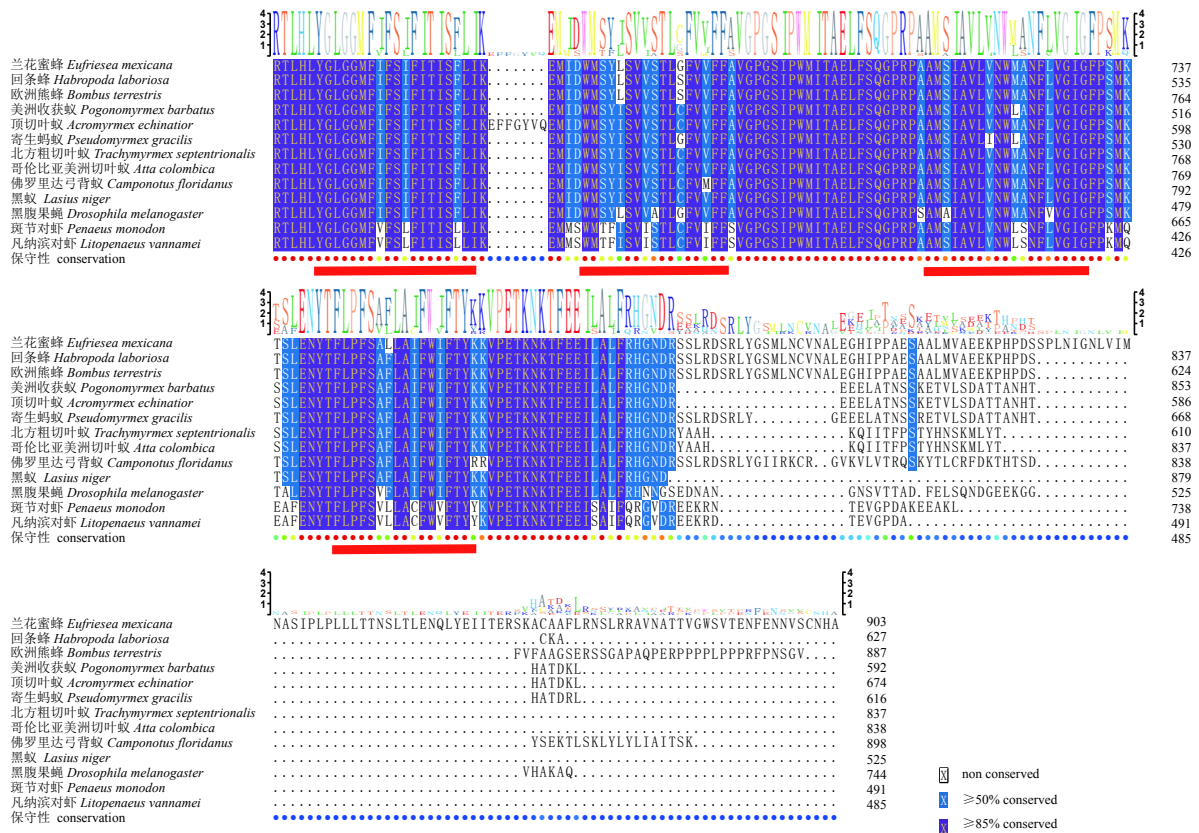


图3 斑节对虾GLUT1氨基酸序列与其他物种氨基酸多重序列比对
红色下横线为 12 个跨膜结构域

Fig.3 Comparison of multiple alignment of predicted amino acid sequence of *P. monodon* GLUT1 with other species
Red horizontal lines indicate 12 predicted transmembrane helical structures.

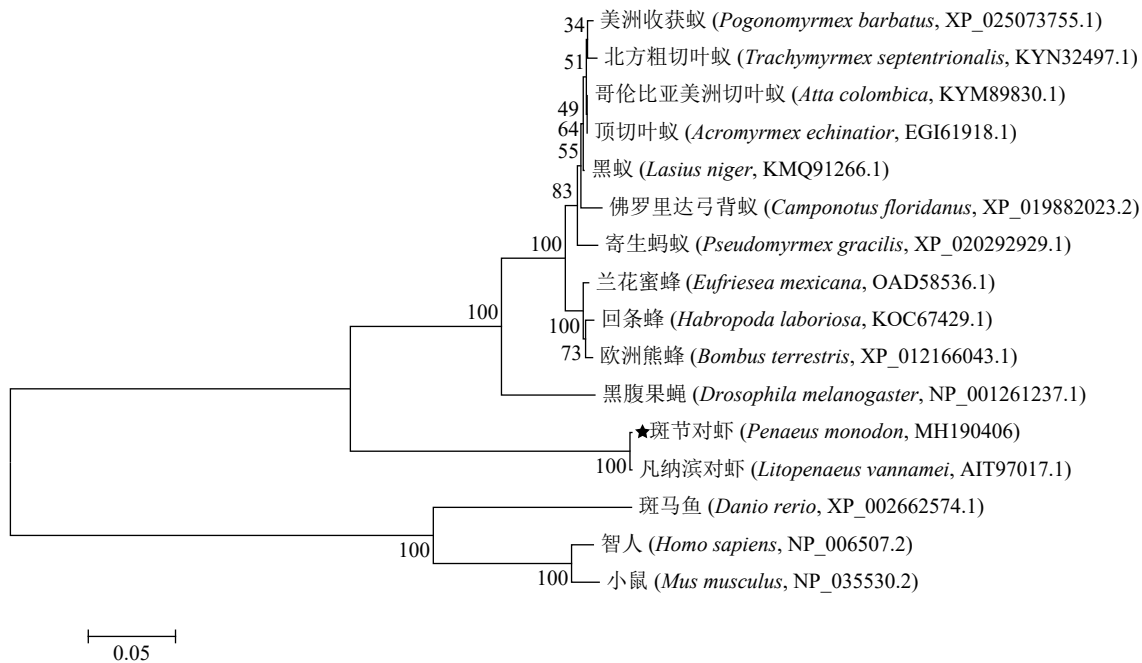


图4 利用MEGA 6.06软件基于NJ法构建的*PmGLUT1*系统进化树
Fig.4 NJ phylogenetic tree of *PmGLUT1* by MEGA 6.06

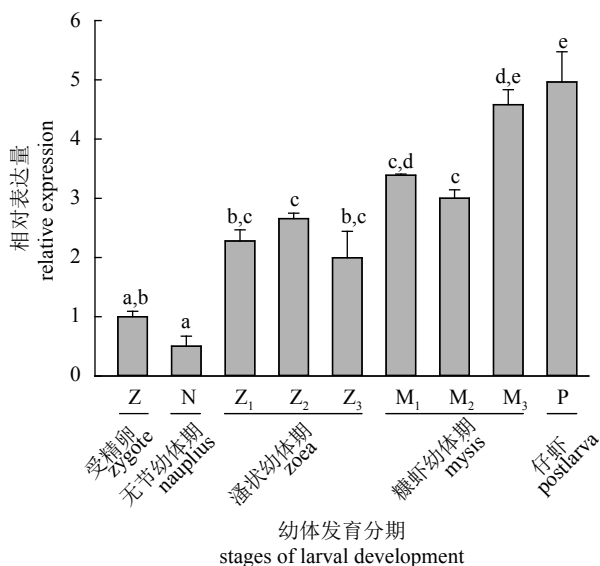


图5 斑节对虾幼体不同发育阶段*PmGLUT1*基因的相对表达量

小写字母不同表示各组之间具有显著差异 ($P < 0.05$); 后图同此
 Fig.5 mRNA relative expression of *PmGLUT1* at different larval developmental stages of larval *P. monodon*
 Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).
 The same case in the following figures.

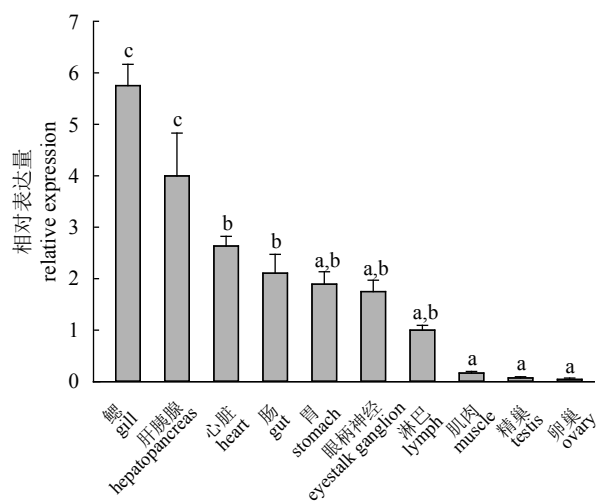


图6 *PmGLUT1*在各组织的相对表达量

Fig.6 mRNA relative expression of *PmGLUT1* in different tissues

相关的基因表达量会升高。GLUT1 参与葡萄糖的转运, 与能量的供应有关^[17], 这与吴勉之等的研究结果相似。

通过对 *PmGLUT1* 在各组织中的表达分析发现, 它在不同组织中均有表达。*PmGLUT1* 在鳃组织和肝胰腺中表达量最高, 说明葡萄糖转运在这两个组织中比较活跃。这与 Martinez-Quintana 等^[8]

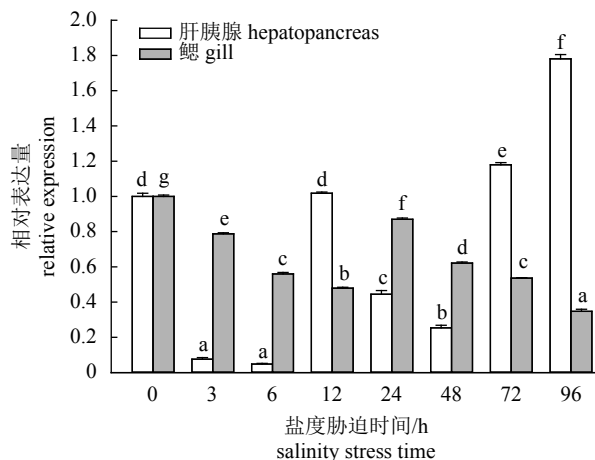


图7 斑节对虾在急性低盐胁迫过程中肝胰腺和鳃组织 *PmGLUT1*的相对表达量

Fig.7 mRNA relative expression of *PmGLUT1* in hepatopancreas and gill under acute low salinity stress

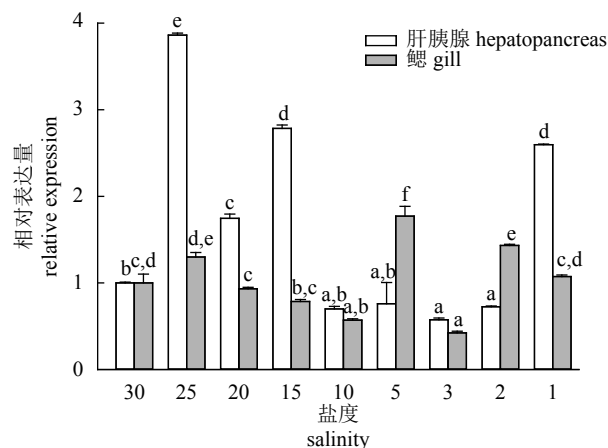


图8 斑节对虾在盐度缓降胁迫过程中肝胰腺和鳃组织 *PmGLUT1*的相对表达量

Fig.8 mRNA relative expression of *PmGLUT1* in hepatopancreas and gill under salinity-lowering stress

的研究结果相似, Martinez-Quintana 等发现 *GLUT1* 基因在凡纳滨对虾鳃组织中的表达量最高。除此之外, Balmaceda-Aguilera 等^[7]发现 *GLUT1* 基因在金头鲷鳃组织中的表达量较肝组织和头肾高。Hall 等^[18]发现 *GLUT1* 基因在大西洋鳕鳃组织中的表达量较肝组织、肌肉和胃高。这可能是由于鳃组织是对虾与外界环境沟通的第一道屏障, 是进行气体交换与离子转运的主要场所, 这些过程需要糖类的代谢来提供能量^[8,19]。肝胰腺是对虾的主要免疫组织, 是糖原合成及糖异生的场所之一, 也需要糖类的代谢来供能^[20], 因此 *PmGLUT1* 在肝胰腺中的高表达可能与此相关。

从急性低盐胁迫实验结果可以看出, *PmGLUT1* 在肝胰腺中的表达量随时间变化呈现出下降-上升-下降-上升的趋势。Wang 等^[21] 研究发现凡纳滨对虾在急性低盐胁迫后, *GLUT1* 在肝胰腺中的表达量也呈现出与本实验类似的趋势。本实验中, *PmGLUT1* 表达量的波动是对虾为了适应低盐环境的一个不断调节的过程, 在这个过程中, 机体需要肝糖原的分解及肌糖原的糖异生作用为各组织提供能量以维持在低盐胁迫时的正常生理活动^[20,22-24]。*PmGLUT1* 在各时间点鳃中的表达量均低于对照组, 盐度 3 是对虾的半致死盐度, *PmGLUT1* 在鳃组织中的表达受到抑制, 可能是由于在半致死盐度胁迫下, 鳃组织受到了损坏, 从而使 *PmGLUT1* 在鳃组织中表达下调。这与 Carmona 等^[25]、王晓杰等^[26]、王艳和胡先成^[27] 的研究结果类似, 当盐度发生骤变及长时间的盐度胁迫时, 会导致水生动物鳃组织结构的损坏。

从盐度缓降胁迫组实验结果可以看出, 随着盐度逐渐降低, *PmGLUT1* 在肝胰腺和鳃中的表达量呈现出上升-下降-上升的变化趋势。水体的盐度直接影响甲壳动物的渗透压, 当盐度缓慢降低, 对虾需要消耗体内存储的能量去适应渗透压的变化^[28-29]。本研究中盐度缓降的过程也是斑节对虾不断调节自身渗透压, 适应低盐环境的过程。当盐度为 1 时, *PmGLUT1* 在鳃组织中的表达量与对照组相近, 说明鳃组织在盐度缓慢降低的过程中可能已经适应该盐度, 而在肝胰腺中的表达量显著高于对照组, 说明仍需要 *PmGLUT1* 将肝糖原或肌糖原分解成的葡萄糖转运至肝胰腺为其提供能量去适应该盐度^[30]。

综上, 本研究克隆了 *PmGLUT1* cDNA 全长, 它在斑节对虾各组织中普遍表达, 在幼体发育及低盐胁迫过程中都发挥了重要作用, 为深入研究葡萄糖转运蛋白基因在斑节对虾幼体发育调控和耐低盐胁迫应答中的分子机制提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 江诚, 谢俊, 陈海峰. 葡萄糖转运蛋白的转运机制研究 [J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(7): 1372-1377.
- [2] ULDRY M, THORENS B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters[J]. Pflugers Arch, 2004, 447(5): 480-489.
- [3] AUGUSTIN R. The protein family of glucose transport facilitators: it's not only about glucose after all[J]. IUBMB Life, 2010, 62(5): 315-333.
- [4] 王尔孚, 李昕, 贾春松, 等. 低氧适应上调大鼠海马神经元和星形胶质细胞在急性缺氧时的葡萄糖转运蛋白的活性和基因表达 [J]. 基础医学与临床, 2009, 29(12): 1273-1276.
- [5] 邱莹, 黄桂菊, 刘宝锁, 等. 企鹅珍珠贝 *GLUT1* 基因全长 cDNA 克隆及其对葡萄糖的表达响应 [J]. 南方水产科学, 2016, 12(5): 81-89.
- [6] 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: 115-135.
- [7] BALMACEDA-AGUILERA C, MARTOS-SITCHA J A, MANCERA J. Cloning and expression pattern of facilitative glucose transporter 1 (GLUT1) in gilthead sea bream *Sparus aurata* in response to salinity acclimation[J]. Comp Biochem Physiol A, 2012, 163(1): 38-46.
- [8] MARTINEZ-QUINTANA J A, PEREGRINO-URIARTE A B, GOLLAS-GALVÁN S, et al. The glucose transporter 1-GLUT1 from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* is up-regulated during hypoxia[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(12): 7885-7898.
- [9] WANG X D, LI E C, CHEN K, et al. Response of facilitative glucose transporter 1 to salinity stress and dietary carbohydrate nutrition in white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquacult Nutr, 2017, 23(1): 90-100.
- [10] LI R X, LIU H Y, DONG X H, et al. Molecular characterization and expression analysis of glucose transporter 1 and hepatic glycolytic enzymes activities from herbivorous fish *Ctenopharyngodon idellus* in respond to a glucose load after the adaptation to dietary carbohydrate levels[J]. Aquaculture, 2018, 492: 290-299.
- [11] LIU H Y, DONG X H, CHI S Y, et al. Molecular cloning of glucose transporter 1 in grouper *Epinephelus coioides* and effects of an acute hyperglycemia stress on its expression and glucose tolerance[J]. Fish Physiol Biochem, 2017, 43(1): 103-114.
- [12] 杨其彬, 叶乐, 温为庚, 等. 盐度对斑节对虾蜕壳、存活、生长和饲料转化率的影响 [J]. 南方水产, 2008, 4(1): 16-21.
- [13] 滕继林, 肖军. 葡萄糖转运蛋白 1 的研究进展 [J]. 生物学教学, 2015, 40(6): 2-3.
- [14] 江世贵, 杨丛海, 周发林, 等. 斑节对虾种虾繁育技术 [M]. 北京: 海洋出版社, 2013: 80-81.
- [15] YANG L, LI X, JIANG S, et al. Characterization of Argonaute2 gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and its responses to immune challenges[J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 36(1): 261-269.
- [16] 吴勉之, 杨丽诗, 周发林, 等. 斑节对虾 2 种高血糖激素家族基因的基因组序列分析和表达研究 [J]. 南方水产科学, 2018, 14(4): 27-36.
- [17] 邱莹. 企鹅珍珠贝葡萄糖转运蛋白 1 同源异构型基因的克隆及对葡萄糖应激的表达响应分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2016: 41-46.
- [18] HALL J R, MACCORMACK T J, BARRY C A, et al. Sequence and expression of a constitutive, facilitated glucose transporter (GLUT1) in Atlantic cod *Gadus morhua*[J]. J Exp Biol, 2004,

- 207(26): 4697-4706.
- [19] MORRIS S. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans[J]. *J Exp Biol*, 2001, 204(5): 979-989.
- [20] VINAGRE A S, da SILVA R S M. Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851)[J]. *Can J Zool*, 2002, 80(8): 1413-1421.
- [21] WANG X D, LI E C, XU Z X, et al. Molecular response of carbohydrate metabolism to dietary carbohydrate and acute low salinity stress in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Turkish J Fish Aquat Sci*, 2017, 17(1): 153-169.
- [22] SÁNCHEZ-PAZ A, GARCÍA-CARREÑO F, HERNÁNDEZ-LÓPEZ J, et al. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *J Exp Mar Bio Ecol*, 2007, 340(2): 184-193.
- [23] OLIVEIRA G T, da SILVA R S M. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in crabs *Chasmagnathus granulata* maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets[J]. *Comp Biochem Physiol B*, 2000, 127(3): 375-381.
- [24] ROSAS C, CUZON G, GAXIOLA G, et al. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels[J]. *J Exp Mar Bio Ecol*, 2001, 259(1): 1-22.
- [25] CARMONA R, GARCÍA-GALLEGO M, SANZ A, et al. Chloride cells and pavement cells in gill epithelia of *Acipenser naccarii*: ultrastructural modifications in seawater-acclimated specimens[J]. *J Fish Biol*, 2004, 64(2): 553-566.
- [26] 王晓杰, 张秀梅, 姜明. 盐度胁迫对许氏平鲉鳃、头肾、脾脏超微结构的影响 [J]. *中国海洋大学学报 (自然科学版)*, 2006(S1): 85-90.
- [27] 王艳, 胡先成. 不同盐度下鲈鱼稚鱼鳃的显微结构观察 [J]. *海洋科学*, 2009, 33(12): 138-142.
- [28] 张硕, 董双林. 饵料和盐度对中国对虾幼虾能量收支的影响 [J]. *大连水产学院学报*, 2002, 17(3): 227-233.
- [29] YE L, JIANG S G, ZHU X M, et al. Effects of salinity on growth and energy budget of juvenile *Penaeus monodon*[J]. *Aquaculture*, 2009, 290(1/2): 140-144.
- [30] YIN S J, ZHANG L M, ZHANG L L, et al. Metabolic responses and arginine kinase expression of juvenile cuttlefish (*Sepia pharaonis*) under salinity stress[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 113: 881-888.