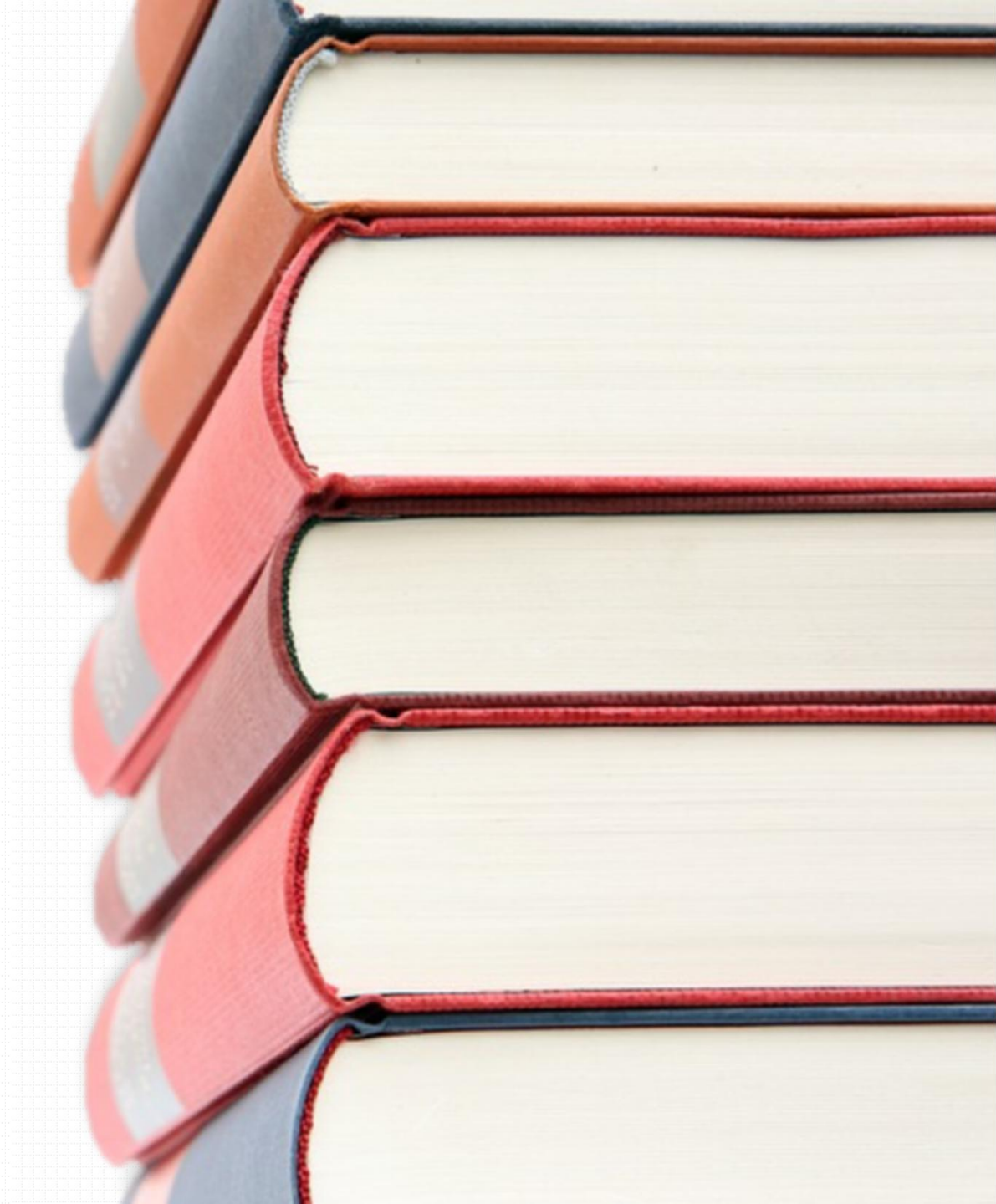


读书报告

- 汇报时间：2018年5月26日
- 汇报人：赵文丽





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture



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



Ruixin Li, Hongyu Liu¹, Xiaohui Dong, Shuyan Chi, Qihui Yang, Shuang Zhang, Beiping Tan*

Laboratory of Aquatic Animal Nutrition and Feed, Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, PR China

题目：GLUT1的分子特征和表达分析，草鱼在适应不同水平的碳水化合物饮食之后，糖负荷下肝糖酵解的酶活性。

目 录

CONTENTS

01 PART ONE 研究背景

03 PART THREE 结果与讨论

02 PART TWO 材料和方法

04 PART FOUR 学习与收获

01

PART ONE

研究背景

鱼类糖尿病体质

- 葡萄糖耐受性差。
- 葡萄糖清除率低。
- 造成这种现象的生理学基础还不能完全理解。
- 解释包括GLUTs的动力学和运输特性的差异以及酶活性调节。



GLUTs（葡萄糖转运蛋白）

- 在哺乳动物中，GLUTs是负责将葡萄糖递送进入细胞以进行糖代谢的转运蛋白，至少包括14个成员。
- 在哺乳动物中，GLUTs的协同作用为细胞提供必需的能量来源，并将血糖水平维持在合适的范围内。

GLUTs功能障碍可导致严重的葡萄糖稳态失调，包括1型和2型糖尿病。

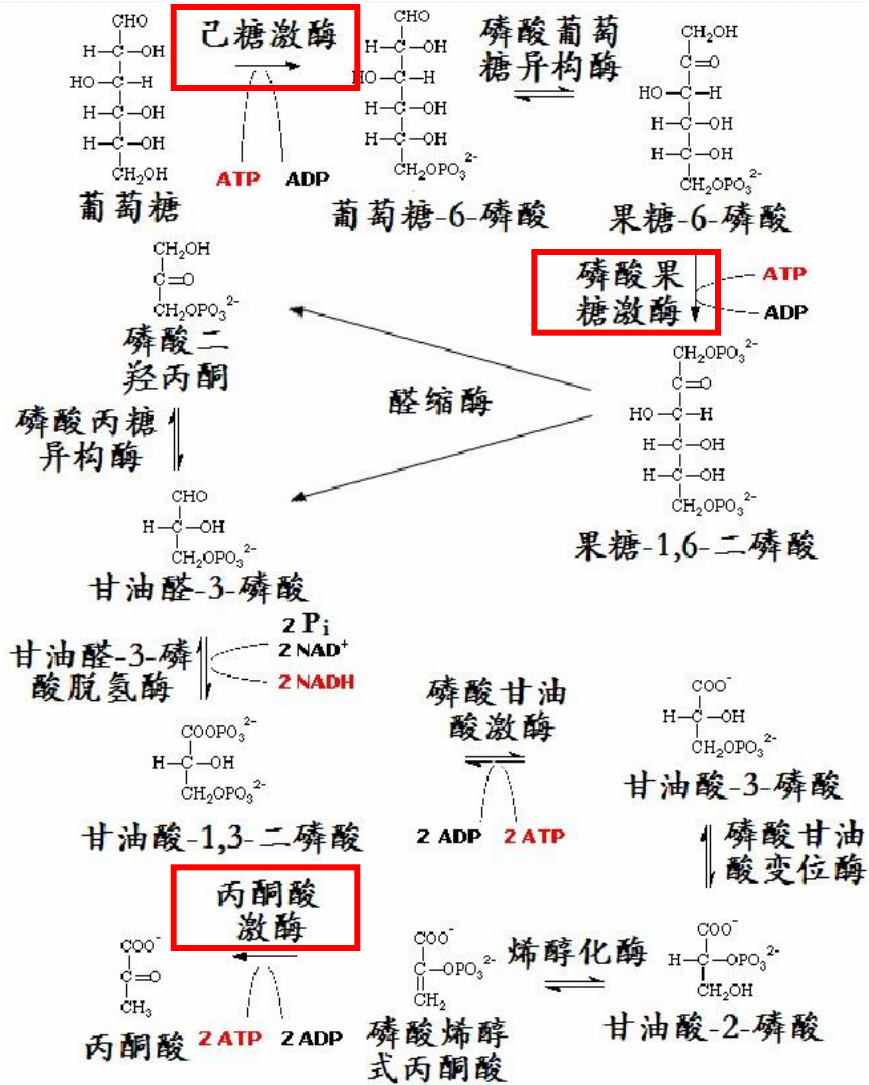
- 已经表明，在鱼类和哺乳动物之间的葡萄糖转运蛋白的调节中存在一些结构和功能上的相似性。

GLUT1

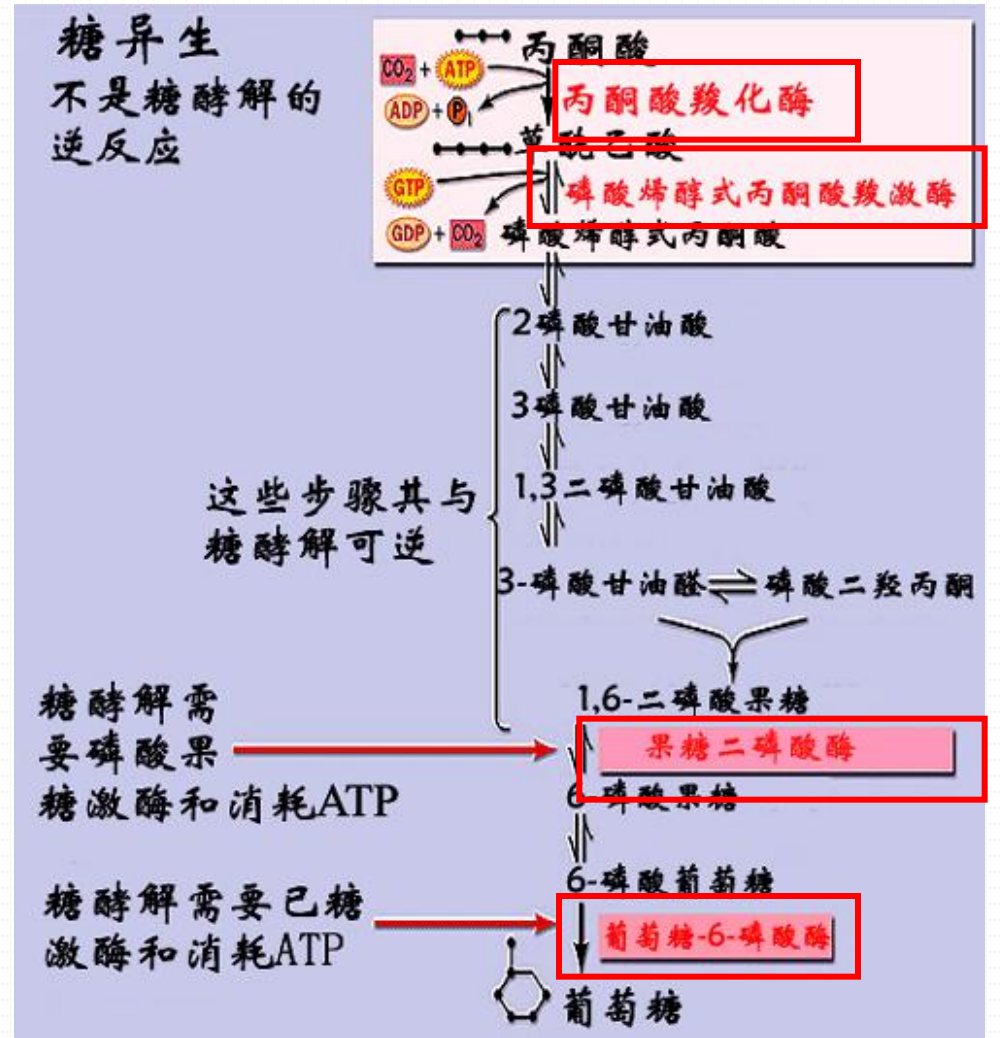
- 主要存在于人类的胰岛中。
- 鱼类和哺乳动物之间存在一些结构和功能上的相似性。



糖酵解途径



糖异生途径



草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)



- 重要的经济淡水鱼。
- 与食肉鱼相比，草鱼具有良好的碳水化合物利用能力。
- 鱼类通过葡萄糖转运和糖酵解，清除葡萄糖负荷的能力与不同膳食碳水化合物的营养史有关。



02

PART TWO

材料和方法

实验对象： 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)

实验内容： 1、**GLUT1**的序列分析和系统发育分析。



2、不同碳水化合物水平饮食适应后，糖负荷下GLUT1的表达量测定和HK、PFK-1的活性测定。

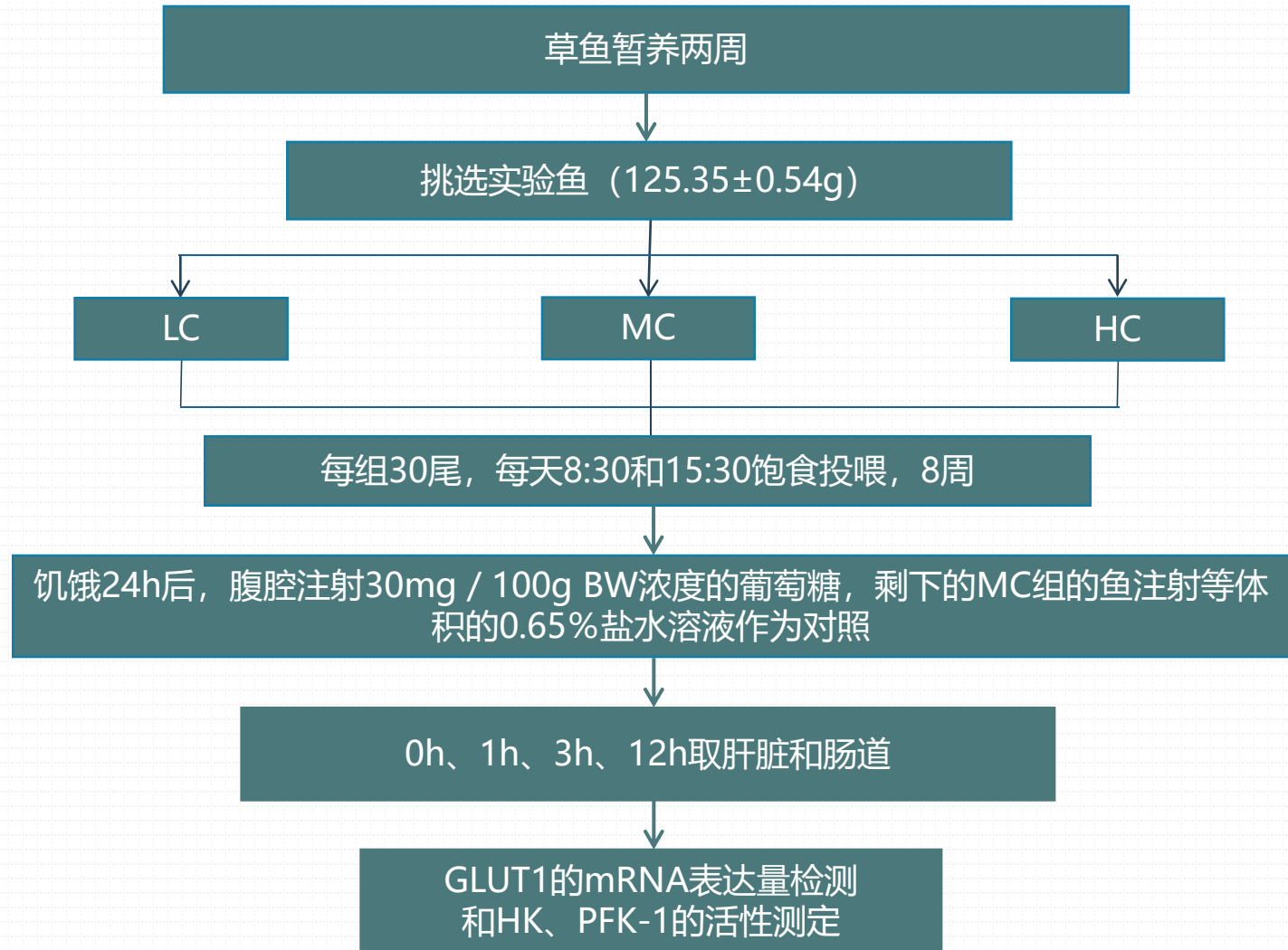
Table 1

The formula and proximate composition of the experimental diets.

	LC	MC	HC
Ingredients (%)			
Fish meal	11	11	11
Casein	25	25	25
Cornstarch	20	40	60
Fish oil	19.8	9.8	0.8
Premix ^a	1.2	1.2	1.2
Calcium biphosphate	0.5	0.5	0.5
Choline chloride	1.5	1.5	1.5
Mildew preventive	0.03	0.03	0.03
Antioxidant	0.01	0.01	0.01
Bentonite	21	11	0
Total	100	100	100
Proximate composition (% air-dry basis)			
Crude protein	30.55	30.02	30.38
Crude lipid	20.38	12.30	2.54
Ash	26.32	16.18	4.97
Carbohydrate	20.34	39.16	60.62
Gross energy ^b (MJ/kg)	18.77	18.68	18.58

- LC (20%, 低碳水化合物)
- MC (40%, 中等碳水化合物)
- MC (60%, 高碳水化合物)

PART TWO 材料和方法





03

PART THREE

结果与讨论

PART THREE 结果与讨论

1 agtcacttttacgggtcgagccgataacttgagaagaaatagaccagataagaaaaagagaagaacaattttatgtcaggaatttgt
91 cagaattcagcaagaagttcgtgagagccatctgaagccatttactcggctcctcatctgaagttacatcacttgtagaagctgtttt
181 atttatttttttactttttatgttcaattttttaacttacaatcgacttctttggaaaaccgagggaaaagaggcgaagtttcag
1 M E G E K Q L T W P L M L A
271 ctgagttaacctacgtcgaaacgtcatcgaaatttgacaagacgttATGGAGGGCGAAAAGCAACTGACCTGGCCGCTGATGCTGGCTG
15 V G T A V I G S L Q F G Y N T G V I N A P Q N I I E A F Y N
361 TAGGGACTGCTGTGATTGGCTCTCTTCAGTTCGGCTACAACACTGGTGAATCAATGCCCCGAAAATATCATTGAGGCCTTCTACAATA
45 K T W N D R Y G E V I P K T T M T T L W S L S V A I F S V G
451 AGACATGGAATGATCGATATGGAGAGGTGATCCCTAAAACAACCATGACTACCCTGTGGTCTCTGTCTGTGGCCATCTTCTGTGGCGC
75 G I V G S F S V G L F V N R F G R R N M L M A N V L A F I
541 GCATTGTGGATCCTTCTCCGTTGGGCTGTTTGTCAACCGTTTTGGAAGGAGAACTCCATGCTCATGGCTAATGTCTGGCTTTCATCG
105 A A A L M G F S K M S A S W E M L I T G R F V V G L Y S G L
631 CTGCAGCACTCATGGGCTTCTCTAAGATGAGTGCATCCTGGGAGATGCTTATTACTGGACGGTTCGTGGTGGCCCTTACTCTGGTCTGT
135 S T G F V P M Y V G E V A P T A L R G A L G T L H Q L G I V
721 CCACAGGTTTTGTGCCATGTACGTGGGTGAGGTGGCTCCACAGCTCTCAGAGGAGCTCTTGGCACCCCTTCATCAGCTGGGCATCGTTA
165 I G I L M A Q I F G M D V I M G N E N T W P L L L G F T F I
811 TTGGCATCTCATGGCACAGATCTTTGGTATGGAAGTTATTATGGGTAACGAAAACACGTGGCCGTGCTCCTGGGCTTTACCTTCATCC
195 P A L L Q C C L L P F C P E S P R F L L I I R N E E N K A K
901 CTGCCCTGCTGCAGTGTGTTACTGCCCTTCTGCCCGAGAGCCCTCGATTTCTCTCATCATCCGCAATGAGGAAAACAAGCCAAT
225 S V L K K L R G T D V A A D M Q E M K E E S R K M M R E K
991 CAGTGCCTAAAAAGCTGCGGGGACGACAGATGTGGCCGACAGATGCAGGAGATGAAGGAGGAGAGCAGAAGATGATGAGAGAGAAGA

991 CAGTGCCTAAAAAGCTGCGGGGACGACAGATGTGGCCGACAGATGCAGGAGATGAAGGAGGAGAGCAGAAGATGATGAGAGAGAAGA
255 K V I P E L F R S T L R Q P I A I A I M L Q L Q Q L S
1081 AAGTCACCATTOCTGAACTGTTCCGCTCTACGCTCTACCGACAGCCCATOGCTATAGCCATCATGCTGCAGCTGTCCCAQCAGCTGTCTG
285 G I N A V P Y Y S T K I F E K A G V K Q P V Y A T I G A G V
1171 GTATCAATGCTGTATTCTACTACTCTACAAAGATCTTTGAGAAGGCAGGTGTGAAACAGCCGGTTTATGCCACTATCGGAGCTGGAGTGG
315 V N T A F T V V S L F V V E R A G R R S L H L L G L L G M A
1261 TCAACACAGCTTCACTGTAGTGTGCTGTTTGTGTGTCGAGCGAGCGGGCGCAGGTCCCTGCAOCTCTTGGGACTCTGGGAATGGCTG
345 G S A V L M T I A L A L L E K Y D W M S Y I S I I A I F G F
1351 GATCTGCTGTATGATGAOCCATTGCTCTTGCTTGTGGAGAAATATGACTGGATGCTCTACATANGCATCATAGCTATCTTTGGGTTTG
375 V A F P E I G P G P I P W F I V A E L F Q G P R P S A F A
1441 TGGCCTCTTTGAGATTGGACCTGGCCCATCCCATGGTTCATTGTGGCTGAACTGTCAGTCAAGGCCCAAGACCCTCGGCTTTGTCTG
405 V A G F S N W T A N F I V G M C F Q Y V E E L C G P Y V F I
1531 TAGCTGGATTCTCCAACCTGGACCGCAAACTTTATTGTGGGATGCTGCTTTCAGTATGTGAGGAGCTCTGTGGCCGTAOCTGTTTATCA
435 I F T I F L L G F F V F T Y F K V P E K G R T F D E I S A
1621 TCTTACCATATTTTACTTGGCTTCTTCGCTTCCACTACTTCAAAGTOCCAGAAACCAAGGGCGGACATTCGATGAAATCTCCGCTG
465 G F Q Q T A S A A E K H S P E E L N S L G A D S Q L *
1711 GTTTC AACAGACAGCGTCAGCGGCTGAGAAGCACTGCCCCAAGAGCTCAACAGCCTGGGGCGGACTCTCAACTTAAaecteteete
1801 tgaaccccgctttcttcatctgttcaacttctgcaegtacactactgagggaaaaggggtcaccaggctatctatacaaacatttccctctt
1891 cctatggctgcaactcaectcttagtccccccgaactccagatgaacacagacatgggtttgaaggcagggtgtaggagtagttat
1981 catattctttttatcagaagatgattgttttaagactgttcagttgtcatatttgcattggagcttttggctagtttgaccagttt
2071 ttatgttttttaactctatttcaactgttacttctgtgtgtctataagagagtgaaaactcgactgaggtcaectgggtcatccccaact
2161 aaectctacactgttgagctcagaactcgacatgtcaatgtgacttctgtaeggcaactgacaattcaactctgtaatccaggttaactg
2251 tatctctattatgaaagtttttagcttctgagttatcatcattagcttagttgtgtttagaagttgaaacaatttaacatgtaaaaaa
2341 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa



Glut1的分子特征:



- 含有12个跨膜结构域, 7个磷酸化位点, 5个转录后调控元件。

GLUT1 mRNA 中发现的所有转录后调节元件的位置

Table 3

Position of all post transcriptional regulatory elements found in mRNA ciGLUT1 after analysis with the RegRNA algorithm.

Element	Position	Region
AU-rich	157-192	5' UTR
Unr-bs	58-71	5' UTR
K-Box	370-377	ORF
MBE	1278-1282	ORF
MBE	1973-1977	3' UTR

AU-rich: 富含AU元件, 在调节mRNA稳定性中起作用的mRNA UTR序列。

Unr-bs: 可以部分控制翻译和mRNA稳定的调控。

K-Box和MBE: 两个负转录后调控元件。

PART THREE 结果与讨论

ci GLUT1的氨基酸排列



深蓝色：相同氨基酸

粉红色：同源氨基酸



黑色下划线：GLUT蛋白中的保守残基

方框：突变导致人类GLUT1功能改变的残基



PART THREE 结果与讨论

- Glut1高度保守。
- 草鱼Glut1与哺乳动物

Glut1具有相似的生理功能。

Human	LQENKEE	RCNMREKKVTI	LELFRS	PAYRQPI	LI	AVVL	QLS	QCLS	GINA	FYYS	TSI	FEK	GV	QPY	YATI	GS	GI	VNTAF	320
Goat	LQENKEE	RCNMREKKVTI	LELFRS	AAYRQPI	LI	AVVL	QLS	QRLS	GINA	FYYS	TSI	FEK	GV	QPY	YATI	GS	GI	VNTAF	320
Mouse	LQENKEE	RCNMREKKVTI	LELFRS	PAYRQPI	LI	AVVL	QLS	QCLS	GINA	FYYS	TSI	FEK	GV	QPY	YATI	GS	GI	VNTAF	320
Gilthead sea bream	MQENKEE	RCNMREKKVTI	PELFRS	NLYRQPLI	LI	AVVL	QLS	QCLS	GINA	FYYS	TRIF	FEK	GV	QPY	YATI	GAG	V	VNTAF	319
Orange-spotted grouper	MQENKEE	RCNMREKKVTI	PELFRS	PLYRQPLI	LI	AVVL	QLS	QCLS	GINA	FYYS	TRIF	FEK	GV	QPY	YATI	GAG	V	VNTAF	319
Tilapia	MQENKEE	RCNMREKKVTI	LELFRS	PLYRQPLI	LI	AVVL	QLS	QCLS	GINA	FYYS	TSI	FEK	GV	QPY	YATI	GAG	V	VNTAF	319
Rainbow trout	MQENKEE	RCNMREKKVTI	LELFRS	PLYRQPI	LI	AVVL	QLS	QCLS	GINA	FYYS	TRIF	FEK	GV	QPY	YATI	GAG	V	VNTAF	240
Carp	MQENKEE	RCNMREKKVTI	PELFRS	PLYRQPI	LI	AVVL	QLS	QCLS	GINA	FYYS	TRIF	FEK	GV	QPY	YATI	GAG	V	VNTAF	308
Blunt snout bream	MQENKEE	RCNMREKKVTI	PELFRS	PLYRQPI	LI	AVVL	QLS	QCLS	GINA	FYYS	TRIF	FEK	GV	QPY	YATI	GAG	V	VNTAF	319
Grass carp	MQENKEE	RCNMREKKVTI	PELFRS	PLYRQPI	LI	AVVL	QLS	QCLS	GINA	FYYS	TRIF	FEK	GV	QPY	YATI	GAG	V	VNTAF	319

Human	TVVSLFVVERAGRR	LHLI	GLAGMAGCA	LNTI	ALALLE	QLP	WMS	YLSI	VAI	FGF	VAF	FEI	GP	PI	PWFI	VAEL	FS	QGPR	400	
Goat	TVVSLFVVERAGRR	LHLI	GLAGMAGCA	LNTI	ALALLE	QLP	WMS	YLSI	VAI	FGF	VAF	FEI	GP	PI	PWFI	VAEL	FS	QGPR	400	
Mouse	TVVSLFVVERAGRR	LHLI	GLAGMAGCA	LNTI	ALALLE	QLP	WMS	YLSI	VAI	FGF	VAF	FEI	GP	PI	PWFI	VAEL	FS	QGPR	400	
Gilthead sea bream	TVVSLFVVERAGRR	LHML	GLLGMAGS	ALNTI	ALALLE	EKL	KWMS	YLSI	VAI	FS	FVAF	FEI	GP	PI	PWFI	VAEL	FS	QGPR	399	
Orange-spotted grouper	TVVSLFVVERAGRR	LHLL	GLLGMAGS	ALNTI	ALALL	DKL	KWMS	YLSI	VAI	FS	FVAF	FEI	GP	PI	PWFI	VAEL	FS	QGPR	399	
Tilapia	TVVSLFVVERAGRR	LHLL	GLLGMAGS	ALNTI	ALALL	DQL	RWMS	YVSI	VAI	FAF	VAF	FEI	GP	PI	PWFI	VAEL	FS	QGPR	399	
Rainbow trout	TVVSLFVVERAGRR	LHLL	GLLGMAGS	ALNTI	ALALL	DQL	RWMS	YVSI	VAI	FAF	VAF	FEI	GP	PI	PWFI	VAEL	FS	QGPR	320	
Carp	TVVSLFVVERAGRR	LHFL	GLLGMAGS	ALNTI	ALALLE	NVP	WMS	YI	SI	VAI	FGF	VAF	FEI	GP	PI	PWFI	VAEL	FS	QGPR	388
Blunt snout bream	TVVSLFVVERAGRR	LHLL	GLLGMAGS	ALNTI	ALALLE	S	YNWMS	YI	SI	VAI	FGF	VAF	FEI	GP	PI	PWFI	VAEL	FS	QGPR	399
Grass carp	TVVSLFVVERAGRR	LHLL	GLLGMAGS	ALNTI	ALALLE	EKYD	WMS	YI	SI	VAI	FGF	VAF	FEI	GP	PI	PWFI	VAEL	FS	QGPR	399

Human	PAAI	AVAGFS	NWTS	NFI	VGMCF	QYVE	QL	CGE	YVFI	IF	TVLL	LV	FFI	F	TYFKVPET	NGRTF	DEI	AS	GFR	CGGAS	QS	DK	. T	478
Goat	LAAI	AVAGFS	NWTS	NFI	VGMCF	QYVE	QL	CGE	YVFI	IF	TVLL	LV	FFI	F	TYFKVPET	NGRTF	DEI	AS	GFR	CGGAS	QS	DK	. T	478
Mouse	PARI	AVAGFS	NWTS	NFI	VGMCF	QYVE	QL	CGE	YVFI	IF	TVLL	LV	FFI	F	TYFKVPET	NGRTF	DEI	AS	GFR	CGGAS	QS	DK	. T	478
Gilthead sea bream	PSAI	AVAGFS	NWT	NFI	VGMCF	QYVE	EL	CGE	YVFI	IF	TVLL	LV	FFI	F	TYFKVPET	NGRTF	DEI	AS	GFR	CT	ATGGEK	HH	. H	479
Orange-spotted grouper	PSAI	AVAGFS	NWT	NFI	VGMCF	QYVE	EL	CGE	YVFI	IF	TVLL	LV	FFI	F	TYFKVPET	NGRTF	DEI	AS	GFR	CTA	ATGGEK	. H	478	
Tilapia	PSAI	AVAGFS	NWT	NFI	VGMCF	QYVE	EL	CGE	YVFI	IF	TVLL	LV	FFI	F	TYFKVPET	NGRTF	DEI	AS	GFR	CT	ATGGEK	. H	477	
Rainbow trout	PSAF	AVAGFS	NWT	NFI	VGMCF	QYVE	EL	CGE	YVFI	IF	TVLL	LV	FFI	F	TYFKVPET	NGRTF	DEI	AS	GFR	CT	ATGGEK	. H	399	
Carp	. LRLS	VACL	NWT	NFI	VGMCF	QYVE	EL	CGE	YVFI	IF	TVLL	LV	FFI	F	TYFKVPET	NGRTF	DEI	AS	GFR	C	AA	AAEK	. H	465
Blunt snout bream	PSAF	AVAGFS	NWT	NFI	VGMCF	QYVE	EL	CGE	YVFI	IF	TVLL	LV	FFI	F	TYFKVPET	NGRTF	DEI	AS	GFR	C	AA	AAEK	. H	477
Grass carp	PSAF	AVAGFS	NWT	NFI	VGMCF	QYVE	EL	CGE	YVFI	IF	TVLL	LV	FFI	F	TYFKVPET	NGRTF	DEI	AS	GFR	C	AA	AAEK	. H	477

Human	PEEL	FHPL	GADS	Q																				491	
Goat	PEEL	FHPL	GADS	Q																					491
Mouse	PEEL	FHPL	GADS	Q																					491
Gilthead sea bream	PEEL	NS	. LGADS	Q																					491
Orange-spotted grouper	PEEL	NS	. LGADS	Q																					490
Tilapia	PEEL	NS	. LGADS	Q																					489
Rainbow trout	PEEL	NS	. LGADS	Q																					411
Carp	PEEL	NS	. LGADS	Q																					477
Blunt snout bream	PEEL	NS	. LGADS	Q																					489
Grass carp	PEEL	NS	. LGADS	Q																					489



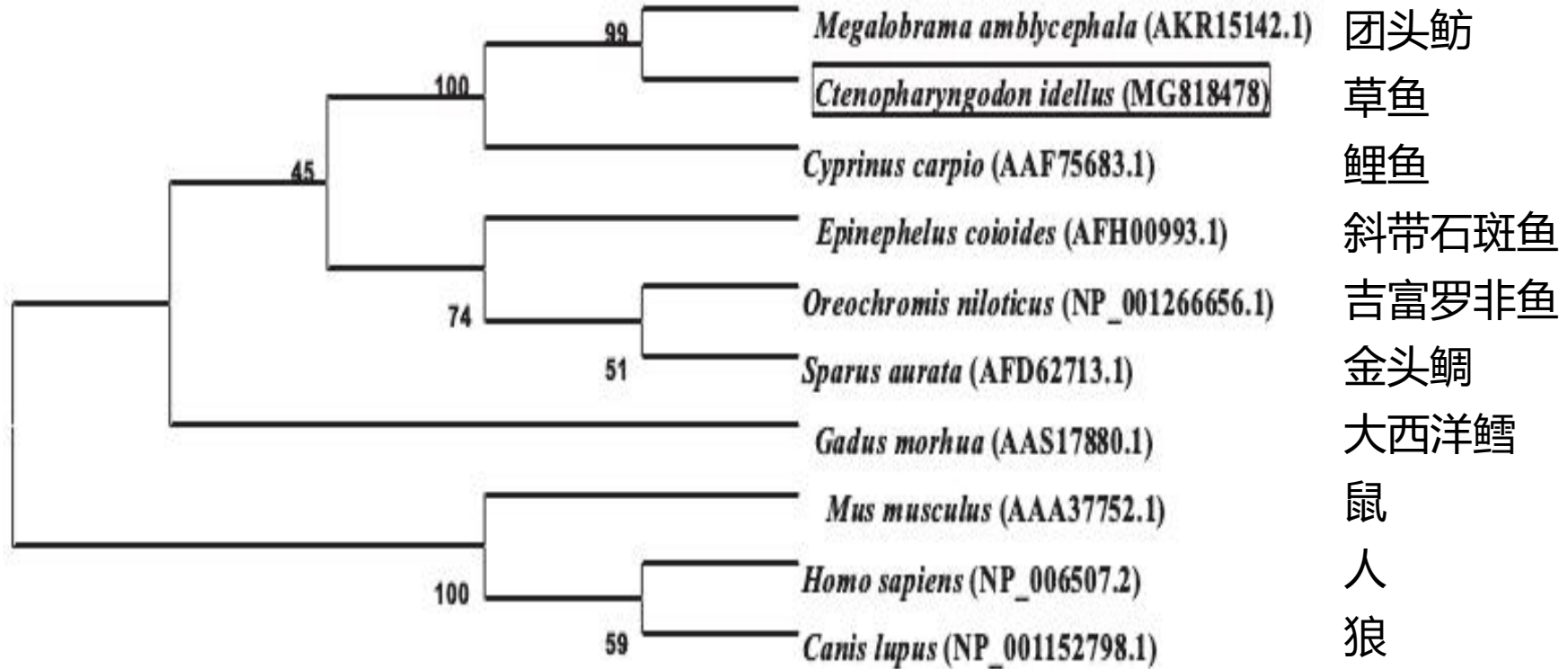


Fig. 3. Phylogenetic tree based on ciGLUT1 AA sequences was made with MEGA 4.0 software using the neighbor-joining method. The numbers represent bootstrap percentages. The topology was tested using bootstrap analyses (1000 replicates). GenBank Accession numbers of the sequences are indicated on figure.

- **GLUT1是GLUT家族的成员并且属于I类。**
- **GLUT1与哺乳动物具有相似的生理功能。**



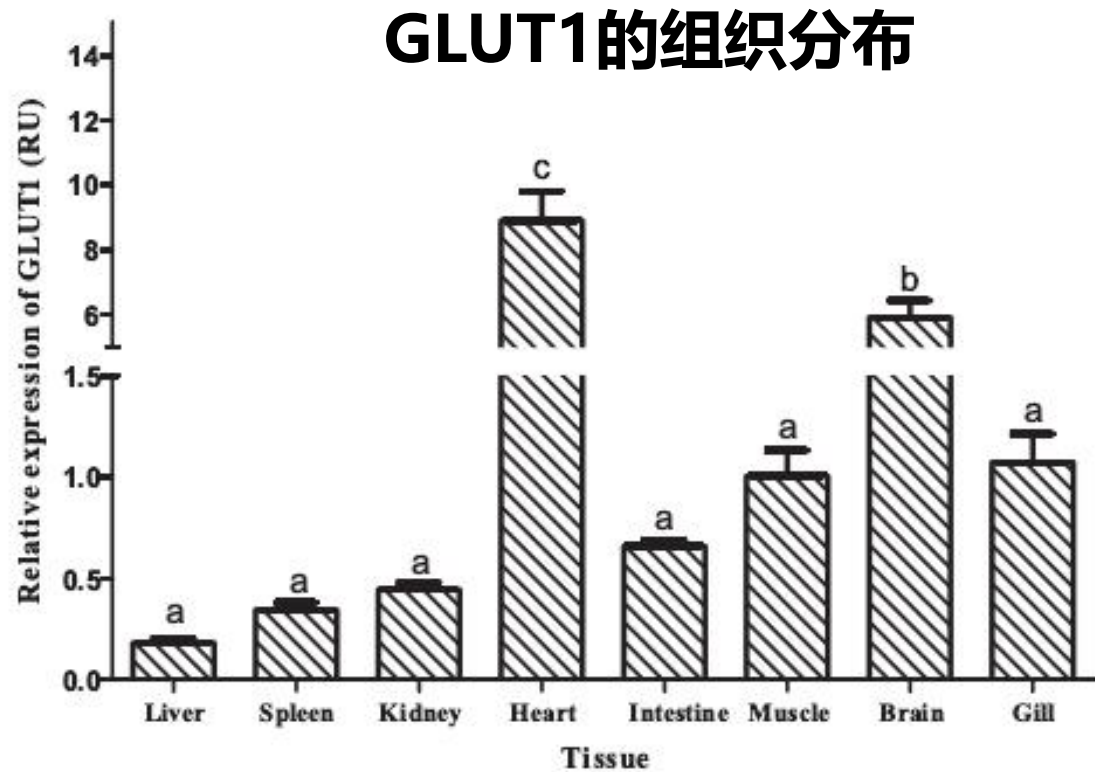
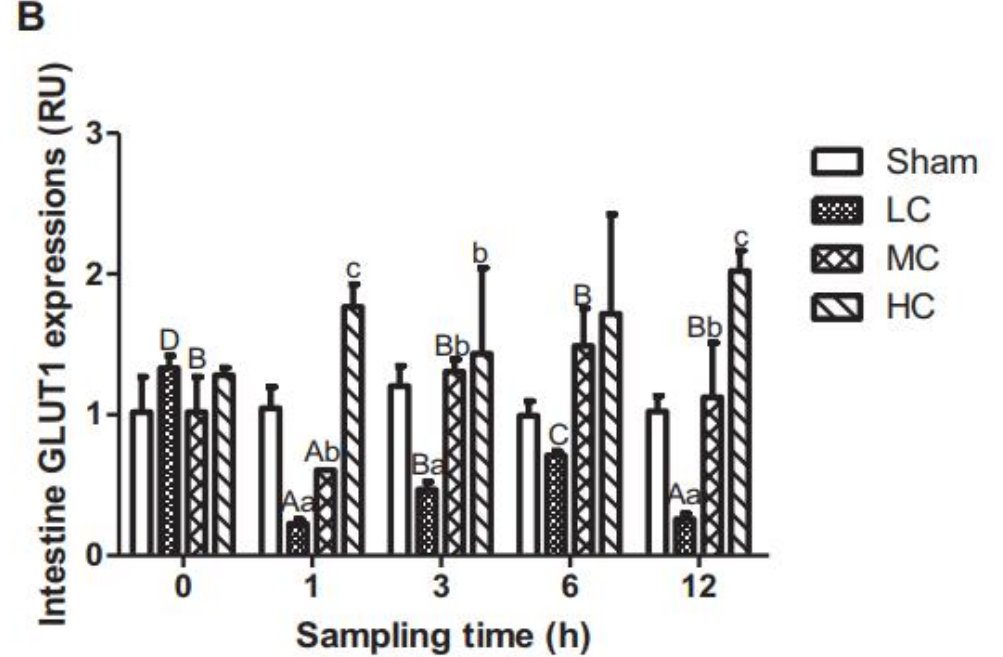
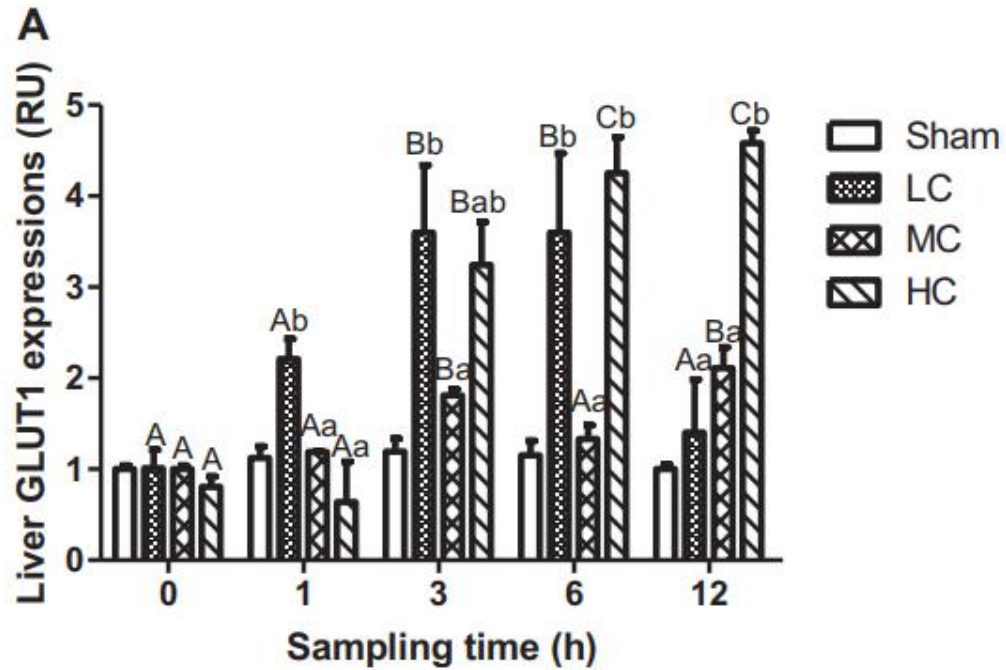


Fig. 4. Relative expressions of ciGLUT1 in various tissues of *C. idellus*. For tissue expressions, data are referred to the values (Relative units, RU) obtained in the muscle. Each data represents the mean of six replicates. Bars assigned with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

- 心脏中发现最高表达水平。
- 脑部表达较高。
- 脾, 肾, 鳃, 肌肉, 肠和肝脏中表达较低。
- 肝脏中表达最低。

说明GLUT1的mRNA的表达量具有组织特异性。

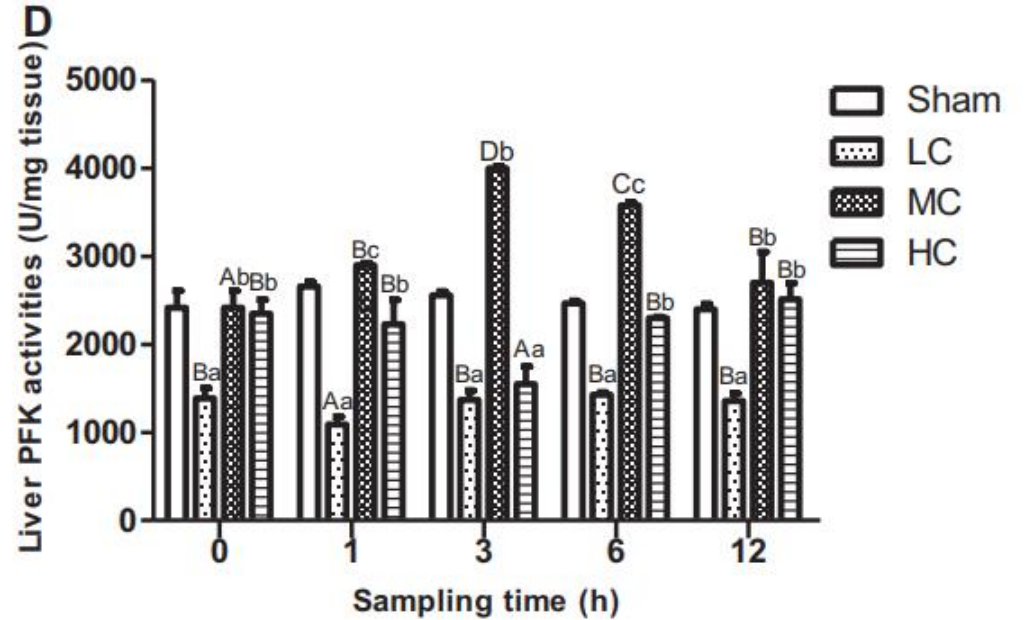
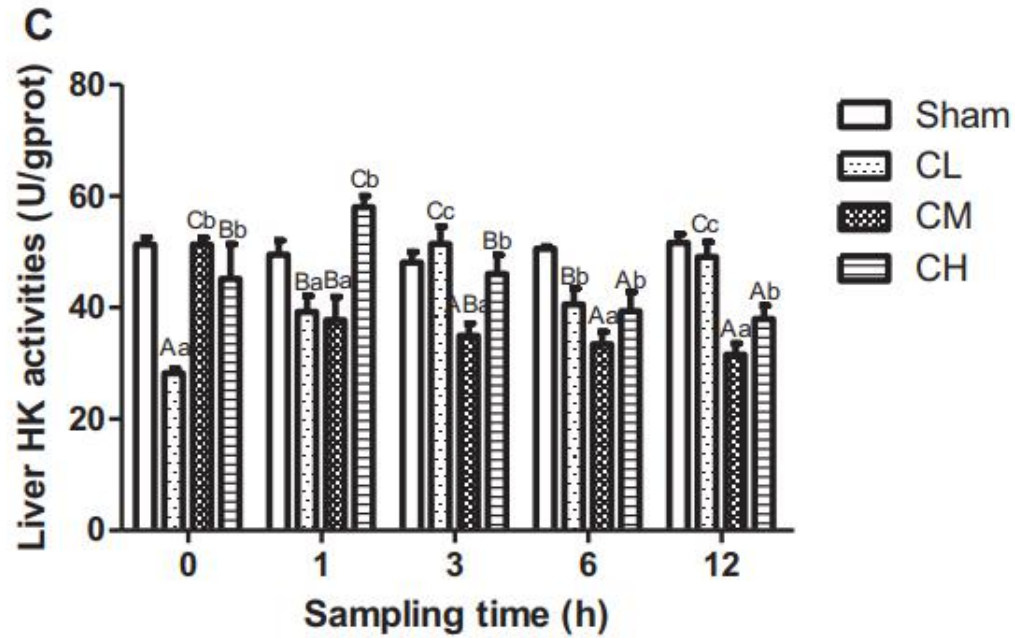
GLUT1 在肝脏和肠道中的表达量



葡萄糖耐量后，肝脏ciGLUT1 mRNA表达量迅速增加，其中LC处理组在1h开始升高，3h升到最高，MC处理组3h升到最高，HC处理组3h开始持续升高。肠道中，LC、MC处理组1h降到最低，HC处理组1h开始升高，整个实验过程高于其他组。

说明不同碳水化合物水平的饮食适应后，肝脏和肠道对葡萄糖的转运能力有影响。

肝脏中葡萄糖激酶和磷酸果糖激酶的活性



HK的活性，LC组最低，糖负荷后，LC组3h升到最高；MC组1h开始降低，12h降至最低；HC组1h升到最高，且HC组更为显著。PFK的活性，LC组无显著变化；MC组1h开始升高，12h恢复；HC组3h降低，6h恢复。

表明，不同碳水化合物的饮食对HK和PFK的活性具有调节作用，HC对HK的活性具有促进作用，MC对PFK的活性具有促进作用。

结论:

- GLUT1是葡萄糖转运蛋白家族的典型结构，并且与其他脊椎动物的相似性（80-97%）相似。
- 不同碳水化合物饮食适应后，糖负荷下，肝脏和肠的GLUT1表达受到影响。
- 不同碳水化合物的饮食对HK和PFK的活性具有调节作用，糖负荷后，HC对HK的活性具有促进作用，MC对PFK的活性具有促进作用。

with that of the other vertebrates. Our results revealed a ubiquitous pattern of ciGLUT1 expression similar to that found in other species. Consistent with the function of the GLUT1 as a constitutive glucose transporter, ciGLUT1 expressions of hepatic and intestine were hardly affected by the changes in dietary carbohydrate. Furthermore, after the



04

PART FOUR

学习与收获

学习了RACE
法克隆基因的
原理

实验方案
的设计

背景知识
的扩展



请各位老师同学 批评指正!

■ 汇报时间：2018年5月26日

■ 汇报人：赵文丽

