

韩 翡, 焦培荣, 韦良孟, 等. 鸽 *TLR7* 基因的克隆、鉴定及表达分析[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(3): 18-23.

鸽 *TLR7* 基因的克隆、鉴定及表达分析

韩 翡¹, 焦培荣¹, 韦良孟^{1,2}, 何 静¹, 宋亚芬¹, 康银峰¹,
崔 进¹, 张 烁¹, 廖 明¹, 任 涛¹

(1 华南农业大学 兽医学院/人兽共患病防控制剂国家地方联合工程实验室/农业部兽用疫苗创制重点实验室/
广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广东 广州 510642; 2 山东农业大学 动物医学院, 山东 泰安 271018)

摘要:【目的】克隆鸽 Toll 样受体(Toll-like receptor 7, *TLR7*)全基因,预测其主要功能区域并分析在鸽的各种组织中的表达情况。【方法】通过 RT-PCR、RACE、相对荧光定量 PCR、生物信息学软件分析方法进行研究。【结果和结论】研究发现鸽 *TLR7* 基因 cDNA 全长 3 516 bp, ORF 全长 3 175 bp, 编码 1 048 个氨基酸。其蛋白结构主要由胞外的富含亮氨酸的结构域(LRRs)、跨膜域(TM)和胞内的 Toll/白介素-1 受体结构域(TIR)3 部分构成。鸽 *TLR7* 基因编码的氨基酸序列与鸿雁 *Anser cygnoides*、绿头鸭 *Anas platyrhynchos*、鸡 *Gallus gallus* 和麻雀 *Taeniopygia guttata* 的相似性均高于 78%, 与哺乳动物的相似性约为 60%, 与鱼类的相似性低于 55%。鸽 *TLR7* 基因在小肠、脾脏、肾脏、肝脏中表达量较高,而在大脑、肺脏、气管、心脏、胰腺、肌肉、皮肤中表达量相对较低。该研究克隆了鸽 *TLR7* 全基因,并预测其主要功能区域。

关键词: 鸽; *TLR7* 基因; 序列分析; 受体表达
中图分类号: S855 文献标志码: A 文章编号: 1001-411X(2014)03-0018-06

Molecular cloning, characterization and expression analysis of the
pigeon toll-like receptor 7 gene

HAN Fei¹, JIAO Peirong¹, WEI Liangmeng^{1,2}, HE Jing¹, SONG Yafen¹, KANG Yinfeng¹,
CUI Jin¹, ZHANG Shuo¹, LIAO Ming¹, REN Tao¹

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/National and Regional Joint Engineering Laboratory for
Medicament of Zoonosis Prevention and Control/Key Laboratory of Animal Vaccine Development, Ministry of Agriculture/
Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control of Guangdong, Guangzhou 510642, China;
2 College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract:【Objective】To clone and characterize the pigeon Toll like receptor 7 (*TLR7*) gene. 【Method】RT-PCR, RACE (rapid amplification of cDNA ends), Quantitative real-time PCR and bio-informatics software was used in this study. 【Result and conclusion】The study showed that the full-length of pigeon *TLR7* cDNA sequence was 3 516 bp with the longest open reading frame (ORF) of 3 175 bp encoding a peptide of 1 048 amino acids. The deduced amino acid sequence of pigeon *TLR7* contained three main structural domains including an extracellular leucine rich repeats domains(LRRs), a transmembrane domain (TM) and a Toll/IL-1 receptor domain(TIR); pigeon *TLR7* shared amino acid sequence similarity with the *Anser cygnoides TLR7* gene, *Anas platyrhynchos TLR7* gene, *Gallus gallus TLR7* gene (above 78%), mammal *TLR7* gene(about 60%), and fish *TLR7* gene (less than 55%). Quantitative real-time PCR analysis revealed that the pigeon *TLR7* mRNA widespread expression in the tested tissues was high in small intestine, spleen, kidney and low in brain, lung, trachea, heart, pancreas, muscle and skin. In this study *TLR7* gene has been isolated from pigeon, cloned and its main functional domains have been predicted.

Key words:pigeon; *TLR7* gene; sequence analysis; receptor expression

Toll 样受体家族(Toll like receptors, TLRs)是一类介导天然免疫的模式识别受体,通过识别病原相关模式分子,激活信号通路,调控炎症因子的释放,从而在天然免疫防御中发挥重要作用^[1]. TLRs 属于 I 型跨膜蛋白,可以分为 3 部分:胞外区(Extracellular domain, ECD)、跨膜区(Transmembrane domain, TM)和胞内区(Toll/IL-1 receptor domain, TIR). 胞外区负责识别病原微生物相关的分子模式(Pathogen associated molecular patterns, PAMPs),其是由 19 ~ 25 个串联的富亮氨酸重复(Leucine-rich repeat. LRR)形成的结构域^[2]. Toll 样受体 7(Toll-like receptor 7, TLR7)能够识别病原微生物的 ss RNA 和部分短的 ds RNA^[3-4]. Toll 样受体 7 基因(*TLR7*)广泛存在于 DC、B 细胞、单核细胞、NK 细胞和 T 细胞等免疫细胞中^[5-6]. 近年来,人类 TLRs 与病原微生物的相互作用研究取得了重大进展. 同时,猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅等家畜的 *TLR7* 基因已被成功克隆^[7-8],并对其中某些分子的功能进行了深入研究^[9-10]. 而鸽 *TLRs* 基因的克隆和功能预测以及其在宿主防御病原微生物中的作用研究较少. 因此本研究将利用 RACE 方法克隆鸽 *TLR7* 基因,并预测其主要功能区,为其深入研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

RNA 抽提试剂盒 RN easy plus Mini (50)为 Qia-gen 公司产品;反转录酶 M-MLV Reverse Transcriptase、T 载体(pMD19-T vector)、dNTP、Ex Taq 酶、3'RACE 试剂盒、5'RACE 试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)均为大连宝生物(TaKaRa)公司产品;核酸染料(EB 替代)为 Biotেকে 公司产品;胶回收试剂盒为 Tiangen 公司产品;pfx 高保真聚合酶为 Invitrogen 公司产品;T4 DNA 连接酶为 NEB 公司产品;DNA Marker 为东盛生物公司产品;大肠埃希菌 DH5α 由华南农业大学禽病室保存.

1.2 方法

1.2.1 引物合成 根据 GenBank 中已公布 *TLR7* 基因序列,鸡(*Gallus gallus*, NM_001011688. 2)、鸭(*Anas platyrhynchos*, DQ888645. 1)、人(*Homo sapiens*, NM_016562. 3)、小鼠(*Mus musculus*, NM_133211. 3)等序列为参考序列,应用 Oligo 7(Molecular Biology Insights Inc., Cascade, CO)设计简并引物. 中间片段 S1 扩增的简并引物 F1/R1. 根据已知参考序列和已经扩增的 S1 序列设计 F2/R2 和 F3/R3. 引物由英潍捷基(广州)贸易有限公司(Life technologies)合成. 本试验所用引物如表 1 所示.

表 1 试验所用引物
Tab.1 PCR primers used in this study

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物	用途
F1	ATGCCTSAACTTGTCTCAGGTAATG	S1	基因克隆
R1	AAGGTTGTCAAAGACTGGCTGTCC		
F2	ACTGTGAKMGTGACTGCA	S2	基因克隆
R2	CTGCCAGAAAATAATGCTCA		
F3	TCAACCAGACTCAAGTGACT	S3	基因克隆
R3	CTGCCAGAAGTAKGGBTGAG		
GSP1	AGACCATATTTGTGCTGACCAAC		3' RACE
GSP2	CCGGCTGAGGAAGAGGCTGTG		
3' Adaptor Primer	CTGATCTAGAGGTACCGGATCC		3' RACE
5' RACE-R4	TTTGCTTCCAGGCTCAGCAGACTTA		5' RACE
5' RACE-R5	CTTCAGACTTGTCTCAGGGCAGCAAACT		
Universal Primer A Mix (UPM)	Long:CTAATACGACTCACTATAGGGCA- AGCAGTGGTATCAACGCAGAGT		Race Method
Nested Universal Primer A (NUP)	Short:CTAATACGACTCACTATAGGGC AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT		
qβ-actin F	CTACAGCTTCAACCACACAGCC		qRT-PCR
qβ-actin R	GCTGTGGCCATCTCCTGCTCAA		
qTLR7 F	GGAAGAGTGCCTGGAATATGGA		qRT-PCR
qTLR7 R	TCCAGATATTTCAATCCAGACA		

1.2.2 总 RNA 的提取及反转录 取 30 mg 新鲜鸽子脾脏,按照 QIAGEN 公司的 RNA easy mini kit 使用说明书进行总 RNA 抽提. 取总 RNA 41 μL , 加入 RNA 酶抑制剂 1 μL , 5 $\times$ buffer 16 μL , 随机引物(Random primer 和 Oligo d T 的混合物)4 μL , dNTP 16 μL , M-MLV 反转录酶 2 μL , 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 ~ 120 min; 70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下作用 15 min 终止反应.

1.2.3 中间片段 S1 的 PCR 扩增与序列测定 按照 Ex Taq 酶说明书的推荐体系, 扩增 *TLR7* 基因中间片段(S1). PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min (1 kb/min), 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 结束反应.

PCR 反应产物用 DNA 凝胶纯化试剂盒回收. 回收产物克隆到 pMD19-T 载体, 挑取单克隆, 菌液 PCR 法筛选疑似阳性克隆, 送测序.

1.2.4 中间片段 S2 和 S3 的 PCR 扩增与序列测定 扩增方法同 S1 的扩增.

1.2.5 3' 端扩增(3' RACE) 根据获得的 S3 片段设计 3' RACE 上游引物: GSP1 和 GSP2; 按 TaKaRa 公司 3' RACE 试剂盒说明书进行操作. 获得 *TLR7* 基因 3' 末端完整序列.

首先进行反转录反应: 按照说明书推荐体系和程序进行反转录. 然后进行 PCR 反应. 一轮 PCR: 50 μL 反应体系为 10 $\times$ PCR Buffer 4 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 3 μL , TaKaRa Taq (5 U/ μL) 0.25 μL , GSP1 0.5 μL , 3' Adaptor primer 0.5 μL , 上述反转录液 1 μL , ddH₂O 40.75 μL ; PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 结束反应. 二轮 PCR 反应条件同一轮 PCR. 产物用 DNA 凝胶纯化试剂盒回收, 产物连接于 pMD19-T 载体上, 筛选出疑似阳性菌送英潍捷基(广州)贸易有限公司测序.

1.2.6 5' 端扩增(5' RACE) 根据获得的 S2 片段设计 5' RACE 下游引物: 5' RACE-R5 和 5' RACE-R4, 按 5' RACE (TaKaRa) 试剂盒说明书进行操作(类似于 3' RACE).

1.2.7 *TLR7* 基因的生物信息学分析 使用 Laser gene Edit seq 软件对扩增出的片段进行拼接, 得到 *TLR7* 基因完整序列. 使用 Meg Align 软件分别对 *TLR7* 基因氨基酸序列与其他动物的 *TLR7* 基因氨基酸序列进行相似性分析、进化树分析. 通过 NCBI Conserved Domain Database (CDD) 在线数据库对 *TLR7* 基因进行结构和功能预测.

1.2.8 实时荧光定量 PCR 检测 *TLR7* 基因组织分布 采集健康鸽的组织(大脑、气管、肺脏、心脏、肝脏、肾脏、脾脏、胰腺、小肠、肌肉、皮肤、法氏囊)为试验材料, 按照 QIAGEN 公司的 RNA easy mini kit 使用说明书抽提总 RNA, 反转成 cDNA, 以其作为模板, 以法氏囊作为参比组织, 以 *\beta*-actin 作为内参基因. 使用 TaKaRa 公司的 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect real time) 试剂盒, 反应体系为: 2 $\times$ SYBR Green mix 10 μL , 上下游引物各 0.2 μL , 模板 cDNA 1 μL , 补去离子水至 20 μL , 每个样做 3 个重复.

实时定量 PCR 在 ABI7500 检测系统上进行, PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火加延伸 34 s (收集荧光信号), 共 40 个循环. 反应完成后进行熔解曲线分析. 程序结束后系统自动生成各个样品的 C_t 值和产物的退火温度值.

1.2.9 数据处理与分析 靶基因与内参基因(*\beta*-actin)的比率计算根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式^[11]. 统计分析使用 Graph Pad Prism 5 软件(Graph Pad Software Inc, San Diego, CA).

2 结果与分析

2.1 鸽 *TLR7* 基因的中间片段 PCR 克隆结果

分别用引物 F1 和 R1 扩增得到 931 bp 的 S1 片段; 引物 F2 和 R2 扩增得到 929 bp 的 S2 片段; 引物 F3 和 R3 扩增得到 601 bp 的 S3 片段. BLAST 对比结果显示这 3 个片段与鸡和鸭的 *TLR7* 基因相似性较高, 说明得到正确的鸽 *TLR7* 基因的部分片段(图 1a ~ 1c).

2.2 鸽 *TLR7* 基因的 3' RACE 和 5' RACE PCR 克隆结果

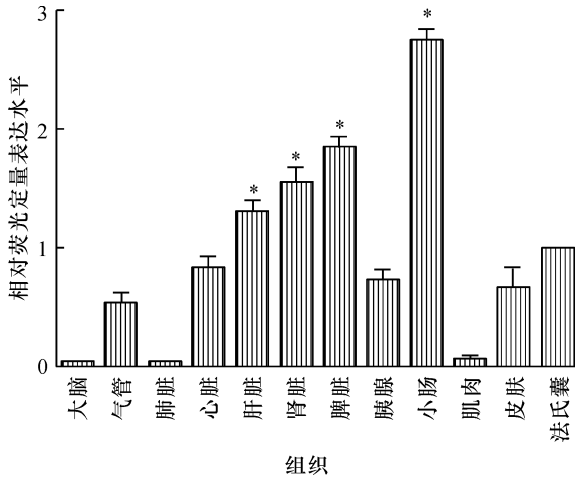
通过 3' RACE 获得大小为 476 bp 的 3' 末端片段, 其含有 18 个 A 组成的 poly (A) 尾, 得到了 *TLR7* 基因的 3' 末端完整序列. 通过 5' RACE 获得大小为 358 bp 的 5' 末端完整序列(图 1d ~ 1e).

2.3 鸽 *TLR7* 基因的序列分析

将各序列拼接后得到 3 516 bp 的 *TLR7* 基因全长 cDNA 序列. 序列分析发现 *TLR7* 基因的最长开放阅读框为 3 175 bp, 编码 1 048 个氨基酸, 相对分子质量为 122 370.3, 等电点 (PI) 为 8.74. 结合 SMART(图 2) 和 TMpred Server 分析预测 *TLR7* 蛋白质二级结构包含有典型的 LRR、TM 和 TIR 区.

2.4 鸽 *TLR7* 基因的分子遗传进化分析

氨基酸同源对比发现, 鸽 *TLR7* 基因编码的氨基



每一个柱子代表的是 *TLR7* 基因在该检测组织中相对于法氏囊的表达量,图中数值为 3 次试验的平均值 $\pm$ 标准差, * 表示在该脏器组织中的表达量与法氏囊相比差异显著 ($P < 0.05$).

图 4 定量分析鸽 *TLR7* 基因在健康组织中的分布
Fig. 4 Quantitative analysis of tissue distribution of *TLR7* gene transcripts in pigeons

3 讨论

模式识别受体 (Pattern recognition receptors, PRRs) 是机体抵御病原微生物感染,启动机体天然免疫的重要组成部分,在先天性免疫中发挥了重要作用^[12]. 病原微生物感染细胞后,PRRs 通过识别病原的病原相关分子模式 (Pathogen associated molecular patterns, PAMPs),促使下游干扰素和细胞因子的分泌,激活一些抗菌或抗病毒蛋白的表达,启动天然免疫应答^[13].

人类 TLRs 家族主要由 TLR1、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7 和 TLR11 这 6 个主要亚家族成员构成. 其中 TLR7 亚家族由 TLR7、TLR8 和 TLR9 构成. 鸡的 Toll 样受体 (ch TLRs) 和人类相似,其 chTLR2、chTLR4、chTLR5、chTLR7 已经被发现. 分析比较鸡和人类基因组信息,发现鸡的表达序列标签 (Expressed sequence tags, ESTs) 和人 TLR1/6/10、TLR2、TLR3、TLR5、TLR7 相关序列高度同源. 目前,研究表明在鸡中至少存在 8 种 TLRs^[14].

本研究根据已公布的部分物种的 *TLR7* 基因序列为参考序列设计简并引物扩增部分片段,获得鸽 *TLR7* 基因的部分保守序列,再结合 cDNA 末端快速扩增技术 RACE (Rapid-amplification of cDNA ends) 及生物信息学分析等技术,获得鸽 *TLR7* 基因的全长序列.

利用 SMART 预测鸽 *TLR7* 基因的功能区,发现其含有典型的 TLRs 家族结构,分子结构由胞外区、跨膜区和胞内区组成,从 N 端到 C 端依次包括信号肽、LRR、1 个富含半胱氨酸的结构域、跨膜区以及胞

内区. 与其他物种的氨基酸序列比较,发现鸽与鸿雁、绿头鸭、鸡、麻雀的氨基酸序列相似性均较高. 从进化分析结果显示,鸽 *TLR7* 基因与麻雀亲缘关系最近;鸽、麻雀、鸡、绿头鸭的 *TLR7* 基因位于同一进化分支,这表明它们的亲缘关系较近. 但其与哺乳动物亲缘关系相对较远,与鱼类亲缘关系最远.

本研究利用荧光定量 PCR 方法检测鸽 *TLR7* 基因在健康组织中的表达,发现在小肠、脾脏、肾脏、肝脏中表达量较高,而在大脑、肺脏、肌肉、心脏中表达量较低. 因此,鸽 *TLR7* 基因在不同组织中的表达存在差异.

在哺乳动物中,TLR7 受体能识别多种小分子抗病毒化合物以及病毒单链 RNA,通过 MyD88 依赖的信号通路诱导促炎症因子和 I 型干扰素的产生,介导机体抗病毒免疫应答,同时 TLR7 活化促进树突状细胞 (Dendritic cells, DC) 表达共刺激分子和趋化因子受体,延长 DC 体外存活时间,增强淋巴细胞增殖能力,因而它在天然免疫和获得性免疫中起到桥梁的作用. 在鸟类中,病毒的单链 RNA 是 TLR7 受体可识别的配体之一,因此,鸟类对病毒的易感性可能与相识别的配体有关. ch TLR7 和相应配体结合后会刺激细胞产生一系列细胞因子和抗病毒蛋白的表达,包括 ch IL-18、ch IL-6、ch IL-8 和 NOS II 等^[15]. 但关于 TLR7 介导的抗病毒、抗肿瘤和免疫调节机制还不清楚,还有待深入研究.

基于 *TLR7* 基因在抗病毒天然免疫中的重要作用,本研究克隆了鸽 *TLR7* 基因,用生物信息学方法进行了序列分析,并预测其主要功能区域,为深入研究其识别病原相关分子模式的机制奠定基础.

参考文献:

[1] 李国勤, 卢立志. 动物关键模式识别受体及其抗病毒天然免疫作用研究进展[J]. 生命科学, 2011, 23(1): 77-80.

[2] AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity[J]. Cell, 2006, 124(4): 783.

[3] AKIRA S, TAKEDA K. Toll-like receptor signaling[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(7): 499-511.

[4] YONEYAMA M, FUJITA T. Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors [J]. Immunity, 2008, 29(2): 178-181.

[5] GEIJTENBEEK T B, GRINGHUIS S I. Signalling through C-type lectin receptors: Shaping immune responses [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(5): 465-479.

[6] SU Jianguo, HUANG Teng. Molecular cloning and immune responsive expression of MDA5 gene, a pivotal member of the RLR gene family from grass carp (*Ctenopharyngodon*

- idella)[J]. Fish Shellfish Immunol,2010,28(1):712-718.
- [7] WEI Liangmeng, JIAO Peirong, YUAN Runyu, et al. Goose Toll-like receptor 7 (TLR7), myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and antiviral molecules involved in anti-H5N1 highly pathogenic avian influenza virus response [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2013, 29(2):99-106.
- [8] JIAO Peirong, WEI Liangmeng. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of the Muscovy duck Toll-like receptor 3 (MdTLR3) gene [J]. Poultry Sci, 2012, 91(1):2475-2481.
- [9] WAGNER H. The immuno-biology of the TLR9 subfamily [J]. Trends Immunol, 2004, 25(7):381-386.
- [10] TAKEUCHI O, AKIRA S. Recognition of viruses by innate immunity[J]. Immunol Rev, 2007, 220(1):214.
- [11] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [12] TAKAHASI K, YONEYAMA M. Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I heli-case and activation of antiviral immune responses[J]. Mol Cell, 2008, 29(2):428-440.
- [13] SATH T, KATO H, KUMAGAI Y, et al. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(2):1512-1517.
- [14] LUND J M, ALEXOPOULOU L, SATO A, et al. Recognition of single stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 101(15):5598-5603.
- [15] KARL W, BOEHME, TERESA COMOTON. Innate sensing of viruses by toll-like receptors [J]. Virol, 2004, 78(15):7867-7873.
- 【责任编辑 柴 焰】

(上接第 7 页)

- [20] 林小植, 罗毅平, 谢小军. 饲料碳水化合物水平对南方鲇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.
- [21] 戈贤平, 刘波, 谢骏, 等. 饲料中不同碳水化合物水平对翘嘴红鲌生长及血液指标和糖代谢酶的影响 [J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(3):88-93.
- [22] FERNANDEZ F, MIQUEL A G, CORDOBA M, et al. Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2007, 343(1):1-10.
- [23] ENES P, PANSERAT S, KAUSHIK S. Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles [J]. Comp Biochem Physiol: A: Mol Integr physiol, 2006, 143(1):89-96.
- [24] PANSERAT S, PLAGNES-JUAN E, KAUSHIK S. Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. J Exp Biol, 2001, 204(13):2351-2360.
- [25] PANSERAT S, MÉDALE F, BRQUE J, et al. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. J Nutr Biochem, 2000, 11(1):22-29.
- [26] PANSERAT S, MÉDALE F, BLIN C, et al. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead sea bream, and common carp [J]. Am J Physiol Reg I, 2000, 278(5):1164-1170.
- [27] ENES P, PANSERAT S, KAUSHIK S, et al. Hepatic glucokinase and glucose-6-phosphatase responses to dietary glucose and starch in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles reared at two temperatures [J]. Comp Biochem Physiol, 2008, 149(1):80-86.
- [28] PANSERAT S, PLAGNES-JUAN E, KAUSHIK S. Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. Biechim Biophys Acta, 2002, 1579(1):35-42.
- [29] 俞菊华, 戈贤平, 唐永凯, 等. 碳水化合物、脂肪对翘嘴红鲌 PEPCK 基因表达的影响 [J]. 水产学报, 2007, 31(3):371-376.
- 【责任编辑 柴 焰】