DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20250311004 http://www.yykxjz.cn/

刘浩文, 刘四芳, 李倩, 张天乐, 朱家杰, 俞晓平, 楼宝, 刘峰. 小黄鱼 *gfpt1* 基因克隆及其对高温胁迫和变形假单胞菌感染的响应. 渔业科学进展, 2026, 47(1): 172–183

LIU H W, LIU S F, LI Q, ZHANG T L, ZHU J J, YU X P, LOU B, LIU F. Cloning of the *gfpt1* gene in *Larimichthys polyactis* and its response to high-temperature stress and *Pseudomonas plecoglossicida* infection. Progress in Fishery Sciences, 2026, 47(1): 172–183

小黄鱼 *gfpt1* 基因克隆及其对高温胁迫和变形假单胞菌感染的响应*

刘浩文[1] 刘四芳[1] 李 倩[3] 张天乐[2]
朱家杰[4] 俞晓平[1] 楼 宝[2] 刘 峰[2①]

(1. 中国计量大学生命科学学院 浙江 杭州 310018；2. 浙江省农业科学院水生生物研究所/全省近岸生物种质资源保护与利用重点实验室 浙江 杭州 310021；3. 浙江海洋大学 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 浙江 舟山 316022；4. 宁波大学海洋学院 浙江 宁波 315832)

摘要 夏季频发的高温以及养殖过程中变形假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*)引起的内脏白点病已成为制约小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)养殖业发展不容忽视的问题。谷氨酰胺果糖-6-磷酸转氨酶-1 (*gfpt1*)基因是信号转导和应激响应的关键调节因子。为探究 *gfpt1* 基因在小黄鱼对高温胁迫和变形假单胞菌感染过程中的响应特征，本研究首次克隆获得小黄鱼 *gfpt1* 基因的 CDS 序列，序列长度为 2 049 bp，编码 682 个氨基酸，含有 PLN02981 super family 保守结构域，同源序列比对发现，其与大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)相似性最高，达 99.37%。荧光定量检测发现，*gfpt1* 基因在各组织中广泛表达，但表达量具有组织差异性，肝脏中的表达量显著高于其他组织。通过荧光定量 PCR 技术检测 32 ℃高温胁迫和变形假单胞菌感染不同时间小黄鱼肝脏中 *gfpt1* 表达水平变化发现，高温胁迫导致 *gfpt1* 表达量显著增加，随着高温处理时间的延长，基因表达量呈先升高后降低的变化趋势，6 h 时的表达量最高；变形假单胞菌感染同样导致 *gfpt1* 表达量发生显著变化，感染后 6 h 的基因表达量显著低于对照组，随着感染时间的延长，表达量逐渐上升，48 h 时达到最高，此时显著高于对照组，随后表达量逐渐降低，至 96 h 时，其表达量显著低于对照组，说明 *gfpt1* 在小黄鱼响应高温胁迫和病原菌侵染过程中发挥了一定的调节作用，但二者响应机制存在明显不同。本研究揭示了小黄鱼肝脏中 *gfpt1* 在响应高温胁迫和变形假单胞菌感染的表达变化特征，研究结果为深入解析鱼类响应高温胁迫、病原菌感染等过程中的生理调节机制奠定了重要基础。

关键词 小黄鱼；*gfpt1* 基因；克隆；高温胁迫；变形假单胞菌
中图分类号 S91 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2026)01-0172-12

小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)是一种重要的经济鱼类，其肉质鲜美、营养丰富(储天琪等, 2022)，

* 浙江省“三农九方”科技计划(2025SNJF096)、国家自然科学基金(32102765)和浙江省重点研发计划(2021C02055)共同资助。刘浩文，Email: liuhaowenjy@qq.com
① 通信作者：刘 峰，副研究员，Email: lengfeng0210@126.com
收稿日期: 2025-03-11, 收修改稿日期: 2025-04-08

广泛分布于我国黄海、东海和渤海以及朝鲜半岛西海岸(谭鲁玉等, 2018)，位列我国传统“四大海产”之一(Zeng *et al*, 2017)，具有显著的生态与产业价值。然而，过度捕捞及栖息地退化导致小黄鱼野生种群资源锐减(Kim *et al*, 2016)，亟需开展人工繁育，实现种质资源保护。小黄鱼人工繁殖技术于 2015 年取得突破(陈睿毅等, 2016)，2020 年成功实现规模化养殖(Chen *et al*, 2022)。随着养殖范围的不断扩大，环境因素和病害引发的问题日益凸显。高温常常对鱼类代谢系统(Olsvik *et al*, 2013)、免疫系统(Bagath *et al*, 2019)、氧化–抗氧化系统(Belhadj *et al*, 2014)以及神经系统(Leon *et al*, 2015)等多方面造成影响。高温胁迫导致鱼体肝脏发生氧化应激，产生一系列抗氧化反应的转录调控(Dettleff *et al*, 2022)，造成肝脏病理性损伤(Ma *et al*, 2023)和细胞凋亡加剧(何雨等, 2024)等。

小黄鱼与其他海水养殖鱼类一样，易暴发由变形假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*)引起的内脏白点病(visceral white-nodules disease, VWND)，通常造成大面积死亡(Bai *et al*, 2022)，极大限制了小黄鱼养殖业的高质量发展。有研究发现，内脏白点病致病菌的毒性与温度有一定关联，Huang 等(2019)在大黄鱼(*Larimichthyus crocea*)的研究中发现，在不同温度下，变形假单胞菌的 *amyA* 等毒力相关基因发生了差异表达；周琳等(2015)研究发现，虽然变形假单胞菌可引发大黄鱼患内脏白点病，但仅在 16~20 ℃下致病；Tang 等(2019)通过不同温度下变形假单胞菌的转录组比较分析发现，该病菌的毒力发生变化，这或许表明小黄鱼对于高温胁迫响应以及内脏白点病抵抗能力的分子机制有一定的关联。在小黄鱼抗内脏白点病性状 QTL 定位研究中，所获得的 *Pten*、*map2k6*、*Chmp* 等基因通过调节细胞凋亡与自噬来应对内脏白点病的感染，而 *arg1* 通过调节精氨酸代谢来降低炎症反应的损伤(Li *et al*, 2024)；而在小黄鱼的近缘物种大黄鱼中也发现与自噬凋亡、炎症调控密切相关的 MAPK 信号通路可能在其内脏白点病抗性中发挥着关键作用(Bai *et al*, 2023)；并且感染变形假单胞菌会导致大黄鱼出现严重的炎症反应(Chen *et al*, 2025)，从而诱导细胞自噬进程以缓解炎症(Cao *et al*, 2024)。

鱼类肝脏具有解毒、免疫防御等作用，与应激反应密切相关(Li *et al*, 2017)，其作为鱼类的重要营养代谢器官，对于机体建立生理生化平衡以应对环境和物理干扰至关重要(Aguilar *et al*, 2022)，极易受到环境因素变化的影响(Cheng *et al*, 2023)，常被用作环境监测和应激反应研究的生物靶标(Li *et al*, 2022)。谷氨酰胺果糖-6-磷酸转氨酶-1 (GFPT1)由 *gfpt1* 基因编码，该基因首次于 1992 年从人体中克隆得到完整 cDNA 序列(McKnight *et al*, 1992)，是己糖胺生物合成途径(HBP)中的首个限速酶(Holland *et al*, 2024)，参与葡萄糖代谢，承担着糖基化前体的代谢功能。HBP 以葡萄糖、谷氨酰胺以及脂肪酸为底物，在第一个限速步骤中，GFPT 将葡萄糖代谢后的果糖-6-磷酸(F-6-P)与细胞内的谷氨酰胺共同催化生成 6-磷酸葡萄糖胺(GlcN-6-P)，而后经过一系列反应后生成 HBP 过程的终产物尿苷二磷酸-N-乙酰葡糖胺(UDP-GlcNAc) (Nabeebaccus *et al*, 2021)。有研究表明，GFPT 是未折叠蛋白反应(UPR)的介质，该酶的缺失会导致 UPR 受影响，造成自噬减少、细胞凋亡增加(Zhang *et al*, 2024)，可以认为 GFPT 参与了生理免疫应答调节(Cao *et al*, 2024)。在小黄鱼耐高温性状 QTL 定位分析研究中，成功筛选到 *gfpt1* 为响应高温胁迫的关键基因(Liu *et al*, 2025)。因此，*gfpt1* 基因在小黄鱼遭受高温胁迫、病原菌感染的过程中均承担了一定的生理功能。但目前 *gfpt1* 基因在水产动物中的研究鲜见报道。

为了阐明 *gfpt1* 基因在小黄鱼应对高温胁迫和病原菌感染过程中的响应特征，本研究克隆获得小黄鱼 *gfpt1* 序列，并对其进行生物信息学分析。通过荧光定量检测揭示小黄鱼肝脏组织中 *gfpt1* 响应高温胁迫和病原菌感染的表达变化特征。研究结果将为深入解析小黄鱼响应高温胁迫、病原菌感染等过程中的生理调节机制奠定重要基础，也为小黄鱼耐高温、抗病育种以及解析相关分子调节机制提供基础资料和理论支撑。

1　材料与方法

1.1　样品采集

实验用小黄鱼来自象山港湾水产苗种有限公司(浙江宁波)网箱养殖群体，取规格较为整齐、体表无伤、体质健壮、体重为(45.20±12.42) g 的个体 180 尾，养殖于 6 个 0.3 m^3 容积的圆形养殖桶中，每桶 30 尾鱼，暂养 7 d，养殖水温(20.0±0.5) ℃，每天早晚各投喂 1 次人工配合饲料，并于投喂后 30 min 左右通过虹吸法清除桶底粪便、残饵，换水 2/3 以保持水体洁净。实验开始前 24 h 停止投喂，将 6 桶实验鱼随机分为 2 组，分别命名为高温组(HT)和对照组(CT)，每组 3 个平行。CT 组在(20.0±0.5) ℃的自然水温下持续饲养。高温组通过功率 1 000 W 的智能变频加热板将养殖水温以 2 ℃/h 的速率从 20 ℃升高至 32 ℃，并

维持此温度。待达到设定的目标温度后，分别在第 0、6、12 和 24 小时时取对照组与高温组小黄鱼，每个平行各 5 尾，丁香酚麻醉后，快速解剖取肝脏组织，液氮速冻后保存于–80 ℃冰箱，备用。同时，取对照组脑、肠、肌、鳃、肝、肾、脾、皮肤和心脏 9 个组织液氮速冻后–80 ℃冰箱保存，备用。

取规格整齐、体表无伤、体重为(41.81±10.11) g 的小黄鱼 180 尾进行变形假单胞菌感染实验，实验鱼分为 6 桶，暂养 7 d，暂养水温为(18.0±0.5) ℃，其余养殖管理同上，实验开始前 24 h 停止饲喂。在攻毒实验开始时，将 6 桶实验鱼随机分为 2 组，分别命名为攻毒组(TL)和对照组(CL)，每组 3 个平行，采用腹腔注射法进行攻毒实验。将变形假单胞菌菌株在 TSA 固体培养基中活化，TSB 液体培养基中 28 ℃振荡过夜。用菌落形成单位 CFU/mL 计算菌液浓度。实验开始后，攻毒组小黄鱼逐尾腹腔注射 0.5 mL 1×10^3 CFU/mL 的变形假单胞菌菌液。对照组腹腔注射不含细菌的 TSB 0.5 mL。分别在注射后 6、12、24、48、72 和 96 h 时，取对照组与攻毒组小黄鱼，每个平行各 3 尾，共取 9 尾。丁香酚麻醉后，快速解剖取肝脏组织液氮速冻后保存于–80 ℃冰箱，备用。

1.2 RNA 提取与 cDNA 合成

使用 Trizol 法(储天琪等, 2022)提取组织总 RNA，采用 Hifair® Ⅲ 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 试剂盒(上海翌圣生物科技股份有限公司)合成 cDNA，得到的 cDNA 溶液于–20 ℃保存备用。

1.3 引物设计与合成

以小黄鱼基因组序列(GenBank No. GCA_040670005.1)中 *gfpt1* 的 CDS 序列作为参考在 NCBI-Primer-Blast 中设计克隆所需引物，以克隆获得的 CDS 为参考序列，设计荧光定量所需引物，提交至生工生物工程(上海)股份有限公司进行引物合成。荧光定量所用内参基因为*β-actin*，所用引物序列列于表1。

表 1 引物信息
Tab.1 Primer information

引物 Primer	序列 Sequence	用途 Usage
gfpt1-F	TGTGTGGAATCTTCGCCTATC	克隆 Cloning
gfpt1-R	TCTACCGTCACAGACTTGGC	
Q*gfpt1*-F	GAACACTCCCGTCTTCCGAG	RT-qPCR
Q*gfpt1*-R	AGCGCTCCTCTCTCCTTACA	
β-actin-F	GACCTGACAGACTACCTCATG	内参 Reference
β-actin-R	AGTTGAAGGTGGTCTCGTGGA	

1.4 小黄鱼 *gfpt1* 基因 cDNA 全长克隆

以小黄鱼肝脏 cDNA 为模板，扩增目的基因序列，PCR 体系为 25 μL (cDNA 1.0 μL，*gfpt1*-F 1.0 μL，*gfpt1*-R 1.0 μL，Mix 12.5 μL，ddH$_2$O 9.5 μL)。扩增程序：94 ℃ 3 min；94 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min (35 个循环)；72 ℃ 10 min。使用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，采用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(生工生物，上海)割胶回收，确认浓度合格后与 pESI-T 载体连接，再转化到 DH5α 感受态细胞后选取阳性克隆菌株送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.5 小黄鱼 *gfpt1* 基因序列生物信息学分析

获得其基因序列后，通过 NCBI 在线比对 *gfpt1* 序列与其他物种同源性；采用 NCBI ORF finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)寻找开放阅读框，使用DNAMAN软件将其翻译成氨基酸序列；SignalP-5.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/SingnalP-5.0/)软件预测信号肽序列；ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/)预测蛋白质分子质量与等电点；SOPMA (http://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/nps_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和 SWISS (http://www.swissmodel.expasy.org/)预测蛋白二级结构和三级结构；NCBI-BLAST 中的 CD-search 预测保守结构域；Cell-ploc 2.0 (http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/)预测蛋白亚细胞定位；利用 MEGA11 构建系统进化树。

1.6 *gfpt1* 基因表达特征分析

以小黄鱼常温组的肝脏 cDNA 为模板，依次稀释 5 倍，制成 5 个浓度梯度，每个浓度梯度设置 3 个技术重复，采用 SYBR Green 法进行实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)，检测目的引物是否合格(标准曲线：R^2>0.9，扩增效率=0.9~1.1)。以 *β-actin* 作为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析各目的基因相对表达量。RT-qPCR 体系共 20 μL：SYBR Green Master Mix 10 μL，ddH$_2$O 8 μL，上、下游引物各 0.5 μL，cDNA 模板 1 μL。反应程序如下：94 ℃初始变性 30 s；40 个循环，94 ℃变性 5 s，60 ℃变性 30 s，72 ℃变性 10 s，共 40 个循环。相关数据和图形由 GraphPad Prism 9 进行处理。利用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)，采用 Duncan 法进行组间的多重比较分析。

2 结果

2.1 *gfpt1* 基因克隆及序列分析

成功克隆得到小黄鱼 *gfpt1* 基因完整 CDS 序列

2 049 bp，序列信息已提交至 NCBI GenBank 数据库(Gene ID: PQ682467)，其编码的 682 个氨基酸序列特征性结构域注释显示，整个氨基酸序列(1~682 aa)归属于 PLN02981 超家族保守结构域。生物信息学解析显示，该蛋白相对分子量为 76.745 kDa，理论等电点(pI)为 6.15，未检测到典型信号肽序列。蛋白理化性质分析显示，该蛋白由 20 种氨基酸构成，其不稳定指数达 44.96，亲水性总平均值为–0.195，可判定为不稳定亲水蛋白类别(图 1)。通过 Cell-Ploc 2.0 亚细胞定位预测系统分析，显示该蛋白主要定位于细胞质。

gfpt1
Total amino acid number: 682, MW=76 745

```
              10         20         30         40         50         60         70         80         90        100        110        120
    1  ATGTGTGGAATCTTCGCCTATCTTAACTACCATGTGCCAAGGACTCGGCGTGAGATCCTTGAGATCCTCCTCAAAGGCCTCCAGCGTCTGGAGTACCGAGGCTACGACTCAGCCGGTGTT
    1  M  C  G  I  F  A  Y  L  N  Y  H  V  P  R  T  R  R  E  I  L  E  I  L  L  K  G  L  Q  R  L  E  Y  R  G  Y  D  S  A  G  V
             130        140        150        160        170        180        190        200        210        220        230        240
  121  GGAATTGATGGCGGCAACGGCAAGGACTGGGAGTCAAATGCCAAGTCTATCACCCTGATCAAGCAGCGGGGGAAAGTGAAGGTCCTTGATGAGGAGATCCACAAACAGCAGGATATTGAC
   41  G  I  D  G  G  N  G  K  D  W  E  S  N  A  K  S  I  T  L  I  K  Q  R  G  K  V  K  V  L  D  E  E  I  H  K  Q  Q  D  I  D
             250        260        270        280        290        300        310        320        330        340        350        360
  241  CTTGATGTGGAGTTTGACGTTCACGTCGGCATCGCCCACACCCGCTGGGCCACCCACGGTGTGCCAAGCCCGGTTAACAGCCATCCACACAGATCTGACAAGACAAATGAGTTCATTGTC
   81  L  D  V  E  F  D  V  H  V  G  I  A  H  T  R  W  A  T  H  G  V  P  S  P  V  N  S  H  P  H  R  S  D  K  T  N  E  F  I  V
             370        380        390        400        410        420        430        440        450        460        470        480
  361  ATTCACAATGGAATCATCACCAACTACAAAGACCTGAGGAAGTTCTTGGAGAGCAAAGGCTACGAGTTCGAGTCGGAGACCGACACAGAGTCCATCGCCAAGCTGGTGAAGTACATGTAC
  121  I  H  N  G  I  I  T  N  Y  K  D  L  R  K  F  L  E  S  K  G  Y  E  F  E  S  E  T  D  T  E  S  I  A  K  L  V  K  Y  M  Y
             490        500        510        520        530        540        550        560        570        580        590        600
  481  GACAACAGGGAGAGTGACGACATCAGCTTTGCTACGCTGGTGGAACGGGTGACCCAGCAGCTGGAGGGAGCTTTTGCCCTCGTCTTCAAGAGTGTCCACTACCCCGGACAGGCAGTTGGC
  161  D  N  R  E  S  D  D  I  S  F  A  T  L  V  E  R  V  T  Q  Q  L  E  G  A  F  A  L  V  F  K  S  V  H  Y  P  G  Q  A  V  G
             610        620        630        640        650        660        670        680        690        700        710        720
  601  ACAAGGAGGGGAAGTCCTCTGCTGATGGGAGTGAGGAGTGATCACCAGCTGTCCTCAGATCATATTCCTGTGCTCTACCGCTCCTCTGCTAAAGAAAAGAAAAGCTGCACCGCTCTGCCC
  201  T  R  R  G  S  P  L  L  M  G  V  R  S  D  H  Q  L  S  S  D  H  I  P  V  L  Y  R  S  S  A  K  E  K  K  S  C  T  A  L  P
             730        740        750        760        770        780        790        800        810        820        830        840
  721  AGGACAGACCAGGACACCTGCCTGTTCCCTGTGGATGAGAAAGGTGTGGAGTATTATTTTGCCTCAGATGCAAGCGCAGTGATCGAGCACACCAACCGCGTGATCTTCCTGGAGGACGAC
  241  R  T  D  Q  D  T  C  L  F  P  V  D  E  K  G  V  E  Y  Y  F  A  S  D  A  S  A  V  I  E  H  T  N  R  V  I  F  L  E  D  D
             850        860        870        880        890        900        910        920        930        940        950        960
  841  GATGTGGCTGCCGTGATAGAAGGCCGTCTGTCCATCCACAGGATAAAGCGCACGGCCGGAGACTATCCAGCCCGCGCCATCCAGACCCTGCAGATGGAGCTCCAGCAAATCATGAAGGGC
  281  D  V  A  A  V  I  E  G  R  L  S  I  H  R  I  K  R  T  A  G  D  Y  P  A  R  A  I  Q  T  L  Q  M  E  L  Q  Q  I  M  K  G
             970        980        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050       1060       1070       1080
  961  AACTTCAGCTCCTTCATGCAGAAGGAGATCTTTGAACAGCCAGAATCTGTGGTCAACACCATGAGAGGGAGAATCAACTTCGACAACAACACAGTGATCCTGGGTGGACTGAAGGACCAC
  321  N  F  S  S  F  M  Q  K  E  I  F  E  Q  P  E  S  V  V  N  T  M  R  G  R  I  N  F  D  N  N  T  V  I  L  G  G  L  K  D  H
            1090       1100       1110       1120       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190       1200
1 081  ATCAAAGAGATCCAGAGGTGTCGGCGACTTATCCTTATTGCCTGCGGCACCAGCTACCATGCCGGAGTGGCGACCCGCCAGGTTCTCGAGGAGCTGACCGAGCTACCCGTCATGGTGGAG
  361  I  K  E  I  Q  R  C  R  R  L  I  L  I  A  C  G  T  S  Y  H  A  G  V  A  T  R  Q  V  L  E  E  L  T  E  L  P  V  M  V  E
            1210       1220       1230       1240       1250       1260       1270       1280       1290       1300       1310       1320
1 201  CTGGCCAGTGACTTCCTAGACAGGAACACTCCCGTCTTCCGAGACGACGTCTGCTTCTTTATCAGCCAGTCAGGGGAGACTGCTGACAGCCTCATGGCTCTGCGCTACTGTAAGGAGAGA
  401  L  A  S  D  F  L  D  R  N  T  P  V  F  R  D  D  V  C  F  F  I  S  Q  S  G  E  T  A  D  S  L  M  A  L  R  Y  C  K  E  R
            1330       1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400       1410       1420       1430       1440
1 321  GGAGCGCTGACTGTGGGCATCACCAACACAGTGGGCAGCTCCATCTCCAGGGAGACCGACTGCGGAGTCCACATCAACGCTGGGCCTGAGATCGGAGTGGCCAGCACCAAGGCCTACACC
  441  G  A  L  T  V  G  I  T  N  T  V  G  S  S  I  S  R  E  T  D  C  G  V  H  I  N  A  G  P  E  I  G  V  A  S  T  K  A  Y  T
            1450       1460       1470       1480       1490       1500       1510       1520       1530       1540       1550       1560
1 441  AGCCAGTTTGTGGCCCTCATCATGTTTGCGCTCCTCATGTGCGATGACAGGATTTCCATGCAGCCCAGACGTCGTGAGATAATCCAGGGCCTGAGAATCCTTCCAGATCTGATCAAGGAG
  481  S  Q  F  V  A  L  I  M  F  A  L  L  M  C  D  D  R  I  S  M  Q  P  R  R  R  E  I  I  Q  G  L  R  I  L  P  D  L  I  K  E
            1570       1580       1590       1600       1610       1620       1630       1640       1650       1660       1670       1680
1 561  GTCCTCAGTCTGGATGATGAGATCCAGAAGCTGGCGACAGAGCTGTACGAGCAGAAGAGTGTGCTGATTATGGGCAGAGGCTACCACTATGCTACCTGCCTGGAAGGAGCACTGAAAATC
  521  V  L  S  L  D  D  E  I  Q  K  L  A  T  E  L  Y  E  Q  K  S  V  L  I  M  G  R  G  Y  H  Y  A  T  C  L  E  G  A  L  K  I
            1690       1700       1710       1720       1730       1740       1750       1760       1770       1780       1790       1800
1 681  AAGGAAATCACGTACATGCATTCAGAGGGCATCCTGGCCGGAGAGCTGAAGCACGGCCCGCTGGCCCTGGTGGATAAACTCATGCCGGTCATCATGATCATCATGAGAGACCACACCTAC
  561  K  E  I  T  Y  M  H  S  E  G  I  L  A  G  E  L  K  H  G  P  L  A  L  V  D  K  L  M  P  V  I  M  I  I  M  R  D  H  T  Y
            1810       1820       1830       1840       1850       1860       1870       1880       1890       1900       1910       1920
1 801  GTCAAATGTCAGAACGCCCTGCAGCAAGTTGTAGCTCGCCAGGGTCGCCCCATCGTGATCTGCGACAAAGACGACTACGAGACCGTCAAGAACTCCAGCCGCAACATCAAAGTGCCTCAC
  601  V  K  C  Q  N  A  L  Q  Q  V  V  A  R  Q  G  R  P  I  V  I  C  D  K  D  D  Y  E  T  V  K  N  S  S  R  N  I  K  V  P  H
            1930       1940       1950       1960       1970       1980       1990       2000       2010       2020       2030       2040
1 921  TGCGTGGACTGCCTGCAGGGCGTCCTGAGCGTCATCCCGCTGCAGCTGCTGTCCTTCCACCTGGCCGTTCTCCGAGGTTACGACGTGGACTGTCCAAGAAACCTGGCCAAGTCTGTGACG
  641  C  V  D  C  L  Q  G  V  L  S  V  I  P  L  Q  L  L  S  F  H  L  A  V  L  R  G  Y  D  V  D  C  P  R  N  L  A  K  S  V  T

2 041  GTAGAGTGA
  681  V  E  *
```

图 1　小黄鱼 *gfpt1* 基因的 CDS 序列及所预测的氨基酸序列

Fig.1　CDS sequence and predicted amino acid sequence of *gfpt1* gene in small yellow croaker

黑色下划线为保守结构区域。

The black underline is the conserved structure region.

在预测的 GFPT1 蛋白二级结构中，α-螺旋占 42.52%、延伸链占 17.30%、无规则卷曲占 40.18%(图 2A)。SWISS-MODEL 预测结果显示，小黄鱼 GFPT1 的三级蛋白结构与大黄鱼、模式生物斑马鱼(*Danio rerio*)和人类(*Homo sapiens*) GFPT1 的三级蛋白结构具有高度空间构象相似性(图 2B)。

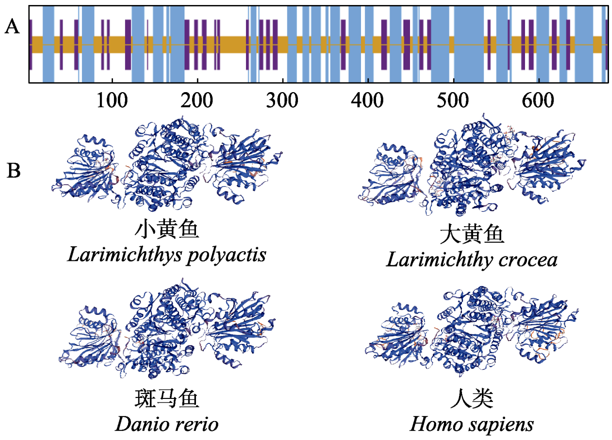

图 2　小黄鱼 *gfpt1* 序列编码的蛋白二级结构(A)和三级结构(B)预测

Fig.2　Prediction of secondary structure (A) and tertiary structure (B) of *gfpt1* sequence encoded protein in *L. polyactis*

蓝色：a 螺旋；紫色：延伸链；黄色：无规则卷曲
Blue: Alpha helix; Purple: Extended chain; Yellow: Random curling

2.2　*gfpt1* 基因序列比对与系统进化树分析

表 2 为小黄鱼 *gfpt1* 序列与其他鱼类同源性分析结果。小黄鱼 *gfpt1* 序列与其他鲈形目(Perciformes)鱼类的相似性均在 87%以上，其中，与大黄鱼的相似性最高，为 99.37%。使用 *gfpt1* 基因序列基于邻接法构建系统进化树，以探究小黄鱼与其他物种之间 *gfpt1* 基因的进化关系.结果显示,脊椎动物 *gfpt1* 基因呈现显著的系统发育簇分化，其中，鱼类分支与以人类为代表的哺乳纲及以热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)为代表的两栖纲显示出显著的进化距离。在鱼类进化节点中，系统发育拓扑结构显示，小黄鱼与大黄鱼形成亲缘关系最近的 2 个姐妹分类群，鲈形目物种(包含石首鱼科等)构成典型进化聚类，与鳉形目(Cyprinodontiformes)物种如白沙鳉(*Cyprinodon tularosa*)、食蚊鱼(*Gambusia affinis*)形成独立进化支。这与生物学亲缘关系相吻合(图 3)。

表 2　小黄鱼 *gfpt1* 序列与其他物种同源性分析

Tab.2　Homology analysis of *gfpt1* sequence in small yellow croaker with other species

物种 Species	目 Order	登录号 Accession No.	相似性 Identity/%
大黄鱼 *Larimichthys crocea*	鲈形目 Perciformes	>XM_010745502.3	99.37
铜带蝴蝶鱼 *Chelmon rostratus*	鲈形目 Perciformes	>XM_041937082.1	93.17
条纹狼鲈 *Morone saxatilis*	鲈形目 Perciformes	>XM_035658039.1	93.07
欧洲鲈 *Dicentrarchus labrax*	鲈形目 Perciformes	>XM_051421496.1	92.92
翘嘴鳜 *Siniperca chuatsi*	鲈形目 Perciformes	>XM_044197982.1	92.68
射水鱼 *Toxotes jaculatrix*	鲈形目 Perciformes	>XR_005894329.1	92.39
黄金鲈 *Perca flavescens*	鲈形目 Perciformes	>XM_028577769.1	92.15
白梭吻鲈 *Sander lucioperca*	鲈形目 Perciformes	>XM_031305086.2	92.15
高体鰤*Seriola dumerili*	鲈形目 Perciformes	>XM_022753765.1	92.04
金钱鱼 *Scatophagus argus*	鲈形目 Perciformes	>XM_046387153.1	92.03
大口黑鲈 *Micropterus salmoides*	鲈形目 Perciformes	>XM_038703942.1	92.00
黄鳍棘鲷 *Acanthopagrus latus*	鲈形目 Perciformes	>XM_037098300.1	91.85
阿肯色镖鲈 *Etheostoma cragini*	鲈形目 Perciformes	>XM_034870877.1	91.71
伯氏肩孔南极鱼 *Trematomus bernacchii*	鲈形目 Perciformes	>XM_034148722.1	90.58
新西兰背唇隆头鱼 *Notolabrus celidotus*	鲈形目 Perciformes	>XM_034691475.1	90.00
布氏新亮丽鲷 *Neolamprologus brichardi*	鲈形目 Perciformes	>XM_006784024.1	88.78
多幅吉鳉 *Girardinichthys multiradiatus*	鳉形目 Cyprinodontiformes	>XM_047381962.1	87.50
食蚊鱼 *Gambusia affinis*	鳉形目 Cyprinodontiformes	>XM_044111139.1	87.50
白沙鳉 *Cyprinodon tularosa*	鳉形目 Cyprinodontiformes	>XM_038285731.1	87.50
杂色鳉 *Cyprinodon variegatus*	鳉形目 Cyprinodontiformes	>XM_015389190.1	87.40
孔雀花鳉 *Poecilia reticulata*	鳉形目 Cyprinodontiformes	>XM_008419029.2	87.30
斑马鱼 *Danio rerio*	鲤形目 Cypriniformes	>NM_001034981.1	82.10
人类 *Homo sapiens*	灵长目 Primate	>NM_001244710.2	73.60
小鼠 *Mus musculus*	啮齿目 Rodentia	>NM_013528.3	76.40
恒河猴 *Macaca mulatta*	灵长目 Primate	>NM_001265907.1	75.40
热带爪蟾 *Xenopus tropicalis*	无尾目 Anura	>XM_002935303.5	75.90

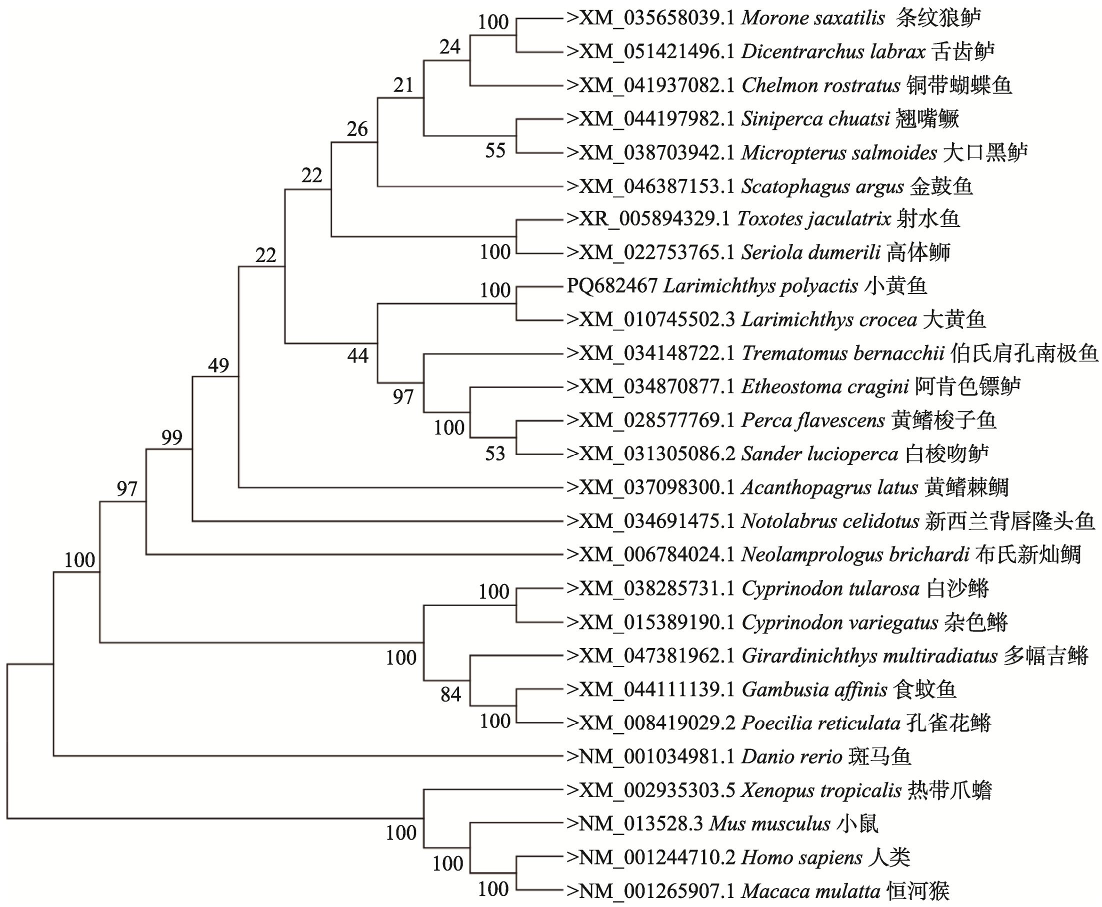

图 3　*gfpt1* 基因不同物种进化分析

Fig.3　Evolutionary analysis of *gfpt1* gene in different species

2.3　*gfpt1* 基因组织表达差异分析

RT-qPCR 检测发现，*gfpt1* mRNA 在小黄鱼肝脏中呈现显著高表达特性，其相对表达量较其他组织(脑、肠、肌肉、鳃、肾、脾、皮肤及心脏)高出 3 倍以上(P<0.05)，说明该基因主要在肝脏中承担生理功能、参与生化过程(图 4)。

2.4　小黄鱼 *gfpt1* 基因在肝脏中对高温胁迫的响应表达

利用 RT-qPCR 检测 32 ℃高温胁迫后小黄鱼肝脏组织中 *gfpt1* mRNA 表达量发现，水温上升至 32 ℃时(即 0 h)，*gfpt1* 表达量即显著高于对照组，随着高温胁迫时间的延长，小黄鱼肝脏中 *gfpt1* 基因表达量呈先上升而后下降的变化趋势，但在各时间点之间基因表达变化未达到显著差异水平。值得注意的是，所有高温处理组的基因表达量均显著高于对照组(P<0.05)，证实 *gfpt1* 在肝脏高温胁迫响应中具有持续性激活特征(图 5)。该表达模式提示，*gfpt1* 可能通过上调表达参与高温胁迫保护机制。

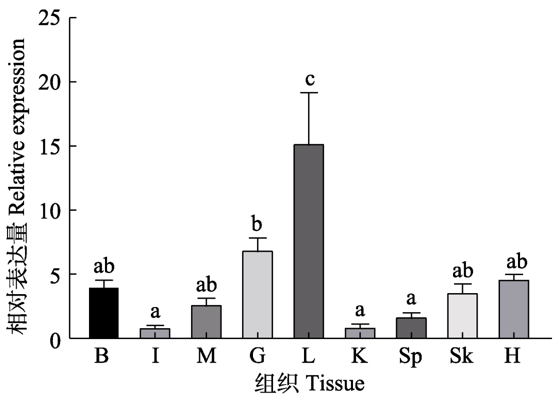

图 4　*gfpt1* 基因在小黄鱼各组织中的表达

Fig.4　Relative expression of *gfpt1* gene in various tissues of small yellow croaker

B：脑；I：肠道；M：肌肉；G：鳃；L：肝脏；K：肾脏；Sp：脾脏；Sk：皮肤；H：心脏。

不同字母表示组间差异显著(P<0.05)。下同。

B: Brain; I: Intestinal tract; M: Muscle; G: Gill; L: Liver; K: Kidney; Sp: Spleen; Sk: Skin; H: Heart. Different letters indicate significant difference (P<0.05). The same below.

2.5 小黄鱼 *gfpt1* 基因在肝脏中对变形假单胞菌感染的响应表达

测定变形假单胞菌感染后不同时间的小黄鱼肝脏组织中 *gfpt1* mRNA 表达量，发现感染后 6 h 基因表达量显著低于对照组。此后，随着感染的持续，基因表达量逐渐上升，在 48 h 时表达量达到最高，并且显著高于对照组(P<0.05)。48 h 后基因表达量逐渐下降且在 96 h 时下降至显著低于对照组的水平。其中，*gfpt1* 在感染后 12、24 和 72 h 三个时间点的表达量与对照组相比无显著差异(图 6)。

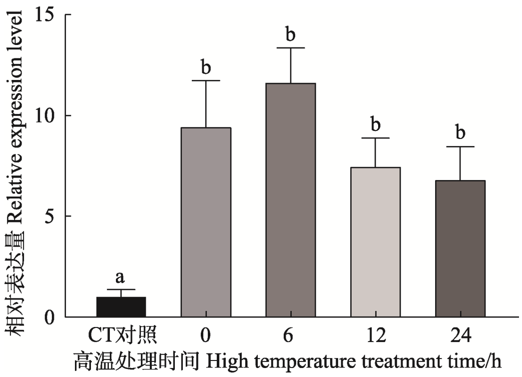

图 5 小黄鱼肝脏 *gfpt1* 对高温胁迫的响应表达
Fig.5 Response expression of liver *gfpt1* in small yellow croaker to high temperature stress

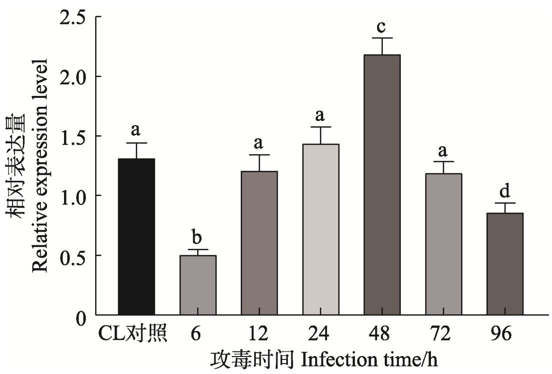

图 6 小黄鱼肝脏 *gfpt1* 对攻毒实验的响应表达
Fig.6 Relative expression of liver *gfpt1* in small yellow croaker in response to challenge test

3 讨论

有研究指出，脊椎动物中的 GFPT 蛋白家族大多为酸性蛋白，且 *gfpt1* 主要在细胞质中表达(Wei *et al*, 2022)；人体中克隆得到的 *gfpt1* 基因共编码 681 个氨基酸，分子量为 77 kDa (McKnight *et al*, 1992)。本研究中，小黄鱼 GFPT1 蛋白相对分子量为 76.745 kDa，属于胞质表达的酸性蛋白，结果与已报道的 GFPT1 蛋白特性相似。但草菇(*Volvariella volvacea*) (Luo *et al*, 2009) GFPT 蛋白含有 697 个氨基酸，与小黄鱼体内 *gfpt1* 基因所编码的氨基酸数目存在差异，这说明动植物之间该蛋白的氨基酸序列具有差异性。基因序列相似性比对发现，小黄鱼的 *gfpt1* 基因与其他几种鲈形目鱼类的相似性均在 87%以上，而与其近缘物种大黄鱼的序列相似性最高(99.37%)。在蛋白三级结构比对中，小黄鱼与大黄鱼、斑马鱼以及人类的 GFPT1 蛋白结构高度相似，表明其在不同物种中可能具有类似的生物学功能(王辰元等, 2015)。肝脏作为鱼类主要的代谢及免疫器官(章孝颖等, 2021)，在各类胁迫下常被作为研究的靶标器官。本研究发现，*gfpt1* 在肝脏中表达量显著高于其他组织，这一现象提示其在肝脏代谢和免疫响应中可能发挥关键作用。

水温被认为是影响鱼类生存和生长的最重要环境因素之一(Besson *et al*, 2016)。随着全球气候变化，夏季频发的持续高温已成为鱼类养殖所面对的一项严峻挑战(Ma *et al*, 2023)。研究表明，高温对鱼类肝脏的影响作用非常明显，如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)遭受高温胁迫时，其肝脏组织受到严重损害(Wang *et al*, 2016)；高温胁迫造成大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)肝脏细胞发生凋亡(Jia *et al*, 2020)；大口黑鲈暴露在 33 ℃以上持续 6 h，肝脏的组织形态发生损伤，肝细胞开始凋亡，内质网应激通路被激活(Zhao *et al*, 2022)。小黄鱼响应高温胁迫的肝脏转录组与蛋白组联合分析发现，差异表达基因/蛋白富集于“内质网中的蛋白质加工”通路(Liu *et al*, 2023)，这一结果与大口黑鲈(Yu *et al*, 2023)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*) (Li *et al*, 2023)等鱼类的研究结果一致。内质网(endoplasmin reticulum, ER)在真核细胞中是蛋白质合成的主要场所。当细胞遭受胁迫后，内质网稳态失衡，触发内质网应激(ERS)和 UPR (Sozen *et al*, 2015)。在本研究中，32 ℃高温胁迫导致小黄鱼肝脏组织中 *gfpt1* mRNA 表达量持续显著上调，说明小黄鱼在面对高温胁迫时，可能通过增强 *gfpt1* 活性，促进 UPR 反应，从而参与到小黄鱼的应激响应和代谢调节，进而维持肝脏功能稳定。有研究表明，在高温胁迫条件下，ERS 及 UPR 更为显著(Zhao *et al*, 2022)，而 *gfpt1* 对维持 UPR 下的蛋白质稳态和减轻内质网应激至关重要(Zhang *et al*, 2024)。小黄鱼耐高温性状的 QTL 和 GWAS 联合定位分析中，筛选到 *gfpt1* 为耐高温性状相关候选基因，其在高温胁迫下显著上调(Liu *et al*, 2025)，本研究在证实该结果的基础上，细化了高温胁迫不同时间的基因表达变化情况，进一步说明其在

高温胁迫过程中发挥了重要的调节作用。*gfpt1* 基因的上调可增加 HBP 反应中 UDP-GlcNAc 的生成(Boehmelt *et al*, 2000), 从而促进蛋白质的正确糖基化(Wang *et al*, 2014), 维持细胞的稳态。这表明 *gfpt1* 在小黄鱼响应高温应激的过程中发挥了重要作用。

目前影响小黄鱼养殖效益的因素, 除了持续高温, 日益严重的病害问题同样不容忽视。由变形假单胞菌感染引起的内脏白点病导致患病鱼的肝脏、脾脏、肾脏等内脏器官出现约 0.5~3.0 mm 的白色结节(Li *et al*, 2020)。通过病理学分析发现, 患病个体肝脏组织表现为炎性细胞浸润、组织坏死以及空泡化, 病变组织中也观察到了病理性结节的形成(张丹枫等, 2017)。内脏白点病相关研究在大黄鱼(Peng *et al*, 2024)、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*) (Dong *et al*, 2019)、斜带髭鲷(*Hapalogenys nitens*) (李慧耀等, 2023)、尖吻鲈(*Lates calcarifer*) (Sun *et al*, 2020)等鱼类中已有报道。已有研究表明, 内脏白点病会在鱼类肝脏中引起炎症反应(邱杨玉等, 2012), 而自噬在炎症反应中发挥重要作用, 通过影响炎症细胞(如巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞)的存活、发育和稳态在炎症反应中发挥重要作用(Qian *et al*, 2017)。此外, Shang 等(2024)研究发现, 自噬可能在调节慢性炎症肉芽肿的形成中发挥关键作用。鱼类在感染变形假单胞菌后出现的白色结节可认为是肉芽肿, 因此可以推测, 自噬的失控可能会导致小黄鱼对内脏白点病的抗性更低。GFPT 是 UPR 反应的介质, 该酶的缺失会导致 UPR 受影响, 造成自噬减少、细胞凋亡增加(Zhang *et al*, 2024); 此外, GFPT 的抑制表达会削弱先天免疫免疫能力(Xia *et al*, 2024)。因此, 可以认为 *gfpt1* 的缺失会削弱小黄鱼对内脏白点病的抵抗能力。有研究表明, 在 UPR 反应期间, 剪切后的 X-box 结合蛋白 1 (spliced X-box binding protein 1, Xbp1-s)是 UPR 中最保守的信号传感器, 是 HBP 的直接转录激活因子, Xbp1-s 可以诱导 *gfpt1* 的表达, 从而增加 UDP-GlcNAc 的生成, 增强蛋白质的正确糖基化(Wang *et al*, 2014), 已证实 UDP-GlcNAc 所参与的修饰可以显著减轻由于 UPR 激活所引起的细胞凋亡(Palorini *et al*, 2013); 此外, 已证实 UDP-GlcNAc 所参与的蛋白 O-GlcNAc 糖基化过程对于 T 细胞的谱系稳定性及效应功能至关重要(Liu *et al*, 2019), 当 *gfpt1* 基因表达发生异常变化引起 HBP 过程的紊乱后, 会导致 T 细胞功能失调, 进而造成自身免疫缺陷或者免疫逃逸的出现(Tang *et al*, 2024)。在本研究对病原菌感染实验后的小黄鱼肝脏 *gfpt1* 响应模式探究中发现, 该基因 mRNA 表达量相较于对照组表现出下调–上调–下调的动态响应。这可能是由于感染初期肝脏内生理环境的稳态被破坏, 先天免疫受损, 而随着时间推移, 机体逐渐适应并启动修复机制, 使 *gfpt1* 表达量上升以减少错误折叠蛋白的积累, 提升细胞对病原侵害的耐受能力; 当病情加重使得肝脏稳态被破坏、机体免疫能力下降后则表现为基因的下调表达。这一结果为理解 *gfpt1* 基因在小黄鱼抗病原菌感染过程中的具体作用提供了重要线索。此外, *gfpt1* 基因在不同感染阶段的表达变化, 揭示了其在抗感染过程中的动态调控机制, 为深入研究小黄鱼免疫防御机制提供了重要线索。因此, *gfpt1* 基因在小黄鱼应对高温胁迫和内脏白点病这两种环境压力中扮演重要角色, 这揭示了其在小黄鱼耐高温、抗病分子调节机制中具有潜在重要研究价值。

4　结论

本研究首次在小黄鱼中克隆验证了 *gfpt1* 基因序列, 明确其肝脏中的表达量显著高于其他组织。研究 32 ℃高温胁迫、变形假单胞菌感染条件下小黄鱼肝脏中 *gfpt1* 基因的响应表达模式, 得出高温胁迫和病原菌感染条件下 *gfpt1* 的表达量变化特征。研究结果丰富了水产动物耐高温、抗病相关分子基础研究内容, 为进一步解析水产动物耐高温、抗病分子调节机制解析提供了重要基础资料。

参　考　文　献

陈睿毅, 楼宝, 詹炜, 等. 小黄鱼亲鱼驯养及苗种繁育. 科学养鱼, 2016(1): 42–43 [CHEN R Y, LOU B, ZHAN W, *et al*. Domestication and fry breeding of parent fish of *Pseudosciaena crocea*. Scientific Fish Farming, 2016(1): 42–43]

储天琪, 刘峰, 陈红林, 等. 小黄鱼肝脏中 *hsp90b1* 和 *hspb1* 对温度胁迫的响应. 农业生物技术学报, 2022, 30(3): 528–538 [CHU T Q, LIU F, CHEN H L, *et al*. Response of *hsp90b1* and *hspb1* to temperature stress in the liver of *Larimichthys polyactis*. Journal of Agricultural Biotechnology, 2022, 30(3): 528–538]

何雨, 刘峰, 张天乐, 等. 高温胁迫对小黄鱼肝脏组织结构和细胞凋亡的影响. 浙江农业学报, 2024, 36(1): 58–66 [HE Y, LIU F, ZHANG T L, *et al*. Histological study on the effect of high temperature stress on liver tissue in *Larimichthys polyactis*. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2024, 36(1): 58–66]

李慧耀, 杨求华, 葛辉, 等. 斜带髭鲷内脏白点病病原的分离鉴定及耐药性分析. 应用海洋学学报, 2023, 42(4): 643–655 [LI H Y, YANG Q H, GE H, *et al*. Isolation, identification and antibiotic sensitivity analysis of bacterial pathogen from *Hapalogenys nitens* with white spot disease in internal organs. Journal of Applied Oceanography, 2023, 42(4): 643–655]

邱杨玉, 郑磊, 毛芝娟, 等. 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)内脏白点病的病原分离和组织病理学观察. 微生物学通报, 2012, 39(3): 361–370 [QIU Y Y, ZHENG L, MAO Z J, *et al*. Isolation and identification of the causative agent and histopathology observation of white-spots disease in internal organs of *Larimichthys crocea*. Microbiology China, 2012, 39(3): 361–370]

谭鲁玉, 王玉堃, 唐学玺, 等. 黄海小黄鱼不同组织中 $\delta^{15}N$ 的分布特征及其生态学意义. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 30–35 [TAN L Y, WANG Y K, TANG X X, *et al*. Distribution characteristics of the stable nitrogen isotope in different tissues of small yellow croaker and the ecological significance in the Yellow Sea. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 30–35]

王辰元, 李萌, 刘宁. 小角 X-射线散射与结构预测法研究中国人乳 β-酪蛋白的三级结构. 中国食品学报, 2015, 15(10): 223–229 [WANG C Y, LI M, LIU N. Studying tertiary structure of human β-casein by using small-angle X-ray scattering and structure prediction. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(10): 223–229]

张丹枫, 安树伟, 周素明, 等. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)内脏白点病的组织病理和超微病理分析. 渔业科学进展, 2017, 38(4): 11–16 [ZHANG D F, AN S W, ZHOU S M, *et al*. Histopathology and ultrastructure of visceral white-spots in *Pseudosciaena crocea*. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(4): 11–16]

章孝颖, 蔡晓芳, 刘贤德, 等. 高温胁迫下大黄鱼肝脏的蛋白质组学. 水产学报, 2021, 45(6): 862–870 [ZHANG X Y, CAI X F, LIU X D, *et al*. Proteomics of liver tissue of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under high temperature stress. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(6): 862–870]

周琳, 覃映雪, 黄力行, 等. 温度对大黄鱼源变形假单胞菌胞外产物酶活力的影响. 集美大学学报(自然科学版), 2015, 20(5): 333–338 [ZHOU L, QIN Y X, HUANG L X, *et al*. Effect of temperature on the enzyme activity of extracellular products of *Peseudomonas plecoglassicida* isolated from *Larimichthys crocea*. Journal of Jimei University (Natural Sciences), 2015, 20(5): 333–338]

AGUILAR A, MATTOS H, CARNICERO B, *et al*. Metabolomic profiling reveals changes in amino acid and energy metabolism pathways in liver, intestine and brain of zebrafish exposed to different thermal conditions. Frontiers in Marine Science, 2022, 9: 835379

BAGATH M, KRISHNAN G, DEVARAJ C, *et al*. The impact of heat stress on the immune system in dairy cattle: A review. Research in Veterinary Science, 2019, 126: 94–102

BAI Y L, CHEN X T, QU A, *et al*. Identification and expression analysis of LncRNAs reveal the immune mechanism of visceral white-nodules disease resistance in large yellow croaker. Marine Biotechnology, 2023, 25(1): 57–69

BAI Y L, QU A, LIU Y, *et al*. Integrative analysis of GWAS and transcriptome reveals p53 signaling pathway mediates resistance to visceral white-nodules disease in large yellow croaker. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 130: 350–358

BELHADJ SLIMEN I, NAJAR T, GHRAM A, *et al*. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. International Journal of Hyperthermia, 2014, 30(7): 513–523

BESSON M, VANDEPUTTE M, VAN ARENDONK J A M, *et al*. Influence of water temperature on the economic value of growth rate in fish farming: The case of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) cage farming in the Mediterranean. Aquaculture, 2016, 462: 47–55

BOEHMELT G, WAKEHAM A, ELIA A, *et al*. Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells. The EMBO Journal, 2000, 19(19): 5092–5104

CAO J F, CHEN J. *Pseudomonas plecoglossicida* infection induces neutrophil autophagy-driven NETosis in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. Frontiers in Immunology, 2024, 15: 1521080

CHEN L H, ZENG W H, RONG Y Z, *et al*. Compositions, nutritional and texture quality of wild-caught and cage-cultured small yellow croaker. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 107: 104370

CHEN Y M, ZHAO H, CAO S S, *et al*. Molecular characterization of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) coagulation factor Ⅶ-like and its function on macrophage proliferation and polarization. Fish & Shellfish Immunology, 2025, 158: 110174

CHENG T, CHEN J D, DONG X H, *et al*. Protective effect of steroidal saponins on heat stress in the liver of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) revealed by metabolomic analysis. Aquaculture Reports, 2023, 33: 101875

DETTLEFF P, ZULOAGA R, FUENTES M, *et al*. High-temperature stress effect on the red cusk-eel (*Geypterus chilensis*) liver: Transcriptional modulation and oxidative stress damage. Biology, 2022, 11(7): 990

DONG H T, SENAPIN S, JEAMKUNAKORN C, *et al*. Natural occurrence of edwardsiellosis caused by *Edwardsiella ictaluri* in farmed hybrid red tilapia (*Oreochromis* sp.) in Southeast Asia. Aquaculture, 2019, 499: 17–23

HOLLAND S H, CARMONA-MARTINEZ R, O'CONNOR K, *et al*. A deficiency in glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1 (*Gfpt1*) in skeletal muscle results in reduced glycosylation of the delta subunit of the nicotinic acetylcholine receptor (AChRδ). Biomolecules, 2024, 14(10): 1252

HUANG L X, ZUO Y F, JIANG Q L, *et al*. A metabolomic investigation into the temperature-dependent virulence of *Pseudomonas plecoglossicida* from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). Journal of Fish Diseases, 2019, 42(3): 431–446

JIA Y D, CHEN X T, WANG Z Y, *et al*. Physiological response of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L) during hyperthermal stress. Aquaculture, 2020, 529: 735645

KIM S, LIM J, LEE K, *et al*. Effect of twine thickness on size-selectivity of driftnet for the yellow croaker *Larimichthys polyactis* in southwestern Sea of Korea. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2016, 34(6): 1199–1208

LEON L R, BOUCHAMA A. Heat stroke. Comparative Physiology, 2015, 5: 611–647

LI C W, WANG S L, REN Q L, *et al*. An outbreak of visceral white nodules disease caused by *Pseudomonas plecoglossicida* at a water temperature of 12 ℃ in cultured large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in China. Journal of Fish Diseases, 2020, 43(11): 1353–1361

LI Q Q, ZHANG J, WANG H Y, *et al*. Transcriptomic response of the liver tissue in *Trachinotus ovatus* to acute heat stress. Animals, 2023, 13(13): 2053

LI Q, ZHU J J, LIU S F, *et al*. QTL mapping-based identification of visceral white-nodules disease resistance genes in *Larimichthys polyactis*. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(20): 10872

LI S W, LIU Y J, LI B L, *et al*. Physiological responses to heat stress in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) revealed by UPLC-QTOF-MS metabolomics and biochemical assays. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 242: 113949

LI Y J, HUANG J Q, LIU Z, *et al*. Transcriptome analysis provides insights into hepatic responses to moderate heat stress in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gene, 2017, 619: 1–9

LIU B, SALGADO O C, SINGH S, *et al*. The lineage stability and suppressive program of regulatory T cells require protein O-GlcNAcylation. Nature Communications, 2019, 10(1): 354

LIU F, LIU H W, ZHANG T L, *et al*. Meta-analysis of QTL mapping and GWAS reveal candidate genes for heat tolerance in small yellow croaker, *Larimichthys polyactis*. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26(4): 1638

LIU F, ZHANG T L, HE Y, *et al*. Integration of transcriptome and proteome analyses reveals the regulation mechanisms of *Larimichthys polyactis* liver exposed to heat stress. Fish & Shellfish Immunology, 2023, 135: 108704

LUO C P, SHAO W L, LI X, *et al*. Molecular cloning, sequencing, and expression of a l-glutamine d-fructose 6-phosphate amidotransferase gene from *Volvariella volvacea*. The Protein Journal, 2009, 28(1): 34–43

MA F, ZHAO L, MA R L, *et al*. FoxO signaling and mitochondria-related apoptosis pathways mediate tsinling lenok trout (*Brachymystax lenok* tsinlingensis) liver injury under high temperature stress. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 251: 126404

MCKNIGHT G L, MUDRI S L, MATHEWES S L, *et al*. Molecular cloning, cDNA sequence, and bacterial expression of human glutamine: Fructose-6-phosphate amidotransferase. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(35): 25208–25212

NABEEBACCUS A A, VERMA S, ZOCCARATO A, *et al*. Cardiomyocyte protein O-GlcNAcylation is regulated by GFAT1 not GFAT2. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2021, 583: 121–127

OLSVIK P A, VIKESÅ V, LIE K K, *et al*. Transcriptional responses to temperature and low oxygen stress in Atlantic salmon studied with next-generation sequencing technology. BMC Genomics, 2013, 14(1): 817

PALORINI R, CAMMARATA F P, BALESTRIERI C, *et al*. Glucose starvation induces cell death in K-ras-transformed cells by interfering with the hexosamine biosynthesis pathway and activating the unfolded protein response. Cell Death & Disease, 2013, 4(7): e732

PENG J, ZHANG S, HAN F, *et al*. C1QBP is a critical component in the immune response of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) against visceral white spot disease caused by *Pseudomonas plecoglossicida*. Fish & Shellfish Immunology, 2024, 146: 109372

QIAN M J, FANG X C, WANG X D. Autophagy and inflammation. Clinical and Translational Medicine, 2017, 6(1): e24

SHANG J B, ZHENG R J, SHENG Y H, *et al*. The role of *Nocardia seriolae*-induced autophagy in the development of chronic inflammation in the liver and the formation of granulomas in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Aquaculture, 2024, 592: 741157

SOZEN E, KARADEMIR B, OZER N K. Basic mechanisms in endoplasmic reticulum stress and relation to cardiovascular diseases. Free Radical Biology and Medicine, 2015, 78: 30–41

SUN Y J, ZHU Z M, WENG S P, *et al*. Characterization of a highly lethal barramundi (*Lates calcarifer*) model of *Pseudomonas plecoglossicida* infection. Microbial Pathogenesis, 2020, 149: 104516

TANG R Q, LUO G, ZHAO L M, *et al*. The effect of a LysR-type transcriptional regulator gene of *Pseudomonas plecoglossicida* on the immune responses of *Epinephelus coioides*. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 89: 420–427

TANG W F, GAO Y, HONG S K, *et al*. GFPT1 accelerates immune escape in breast cancer by modifying PD-L1 *via* O-glycosylation. BMC Cancer, 2024, 24(1): 1071

WANG Y N, LIU Z, LI Z, *et al*. Effects of heat stress on respiratory burst, oxidative damage and SERPINH1 (HSP47) mRNA expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fish Physiology and Biochemistry, 2016, 42(2): 701–710

WANG Z V, DENG Y F, GAO N G, *et al*. Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway. Cell, 2014, 156(6): 1179–1192

WEI S A, XU R, JI Y Y, *et al*. Deduction and exploration of the evolution and function of vertebrate GFPT family. Genes & Genomics, 2022, 44(2): 175–185

XIA W J, JIANG P. p53 promotes antiviral innate immunity by driving hexosamine metabolism. Cell Reports, 2024, 43(2): 113724

YU J J, ZHONG D B, LI S, *et al*. Acute temperature stresses trigger liver transcriptome and microbial community remodeling in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Aquaculture, 2023, 573: 739573

ZENG X X, JIN S T, JIANG J, *et al*. Predict the relationship between gene and large yellow croaker's economic traits. Molecules, 2017, 22(11): 1978

ZHANG R C, FARSHADYEGANEH P, OHKAWARA B, *et al*. Muscle-specific lack of Gfpt1 triggers ER stress to alleviate misfolded protein accumulation. Disease Models & Mechanisms, 2024, 17(8): dmm050768

ZHAO X Q, LI L L, LI C J, *et al*. Heat stress-induced endoplasmic reticulum stress promotes liver apoptosis in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Aquaculture, 2022, 546: 737401

(编辑 冯小花)

Cloning of the *gfpt1* Gene in *Larimichthys polyactis* and Its Response to High-Temperature Stress and *Pseudomonas plecoglossicida* Infection

LIU Haowen[1], LIU Sifang[1], LI Qian[3], ZHANG Tianle[2], ZHU Jiajie[4], YU Xiaoping[1], LOU Bao[2], LIU Feng[2①]

(1. *College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou* 310018, *China*; 2. *Institute of Hydrobiology, Zhejiang Academy of Agricultural Science/Zhejiang Key Laboratory of Coastal Biological Germplasm Resources Conservation and Utilization, Hangzhou* 310021, *China*; 3. *National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan* 316022, *China*; 4. *School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo* 315832, *China*)

Abstract The small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*), a commercially important marine species in the Sciaenidae family, has historically been recognized as one of China's "four major marine products" because of its cultural heritage and economic value. Following breakthroughs in artificial breeding protocols in 2015, this species attained large-scale aquaculture viability by 2020. However, its sustainable production faces critical challenges due to emerging environmental stressors, particularly recurrent marine heat waves exceeding physiological thresholds and *Pseudomonas plecoglossicida*-induced visceral white nodule disease (VWND), which collectively cause high mortality rates under severe conditions. These pressures necessitate urgent exploration of molecular adaptation mechanisms to safeguard aquaculture sustainability. The fish liver, a pivotal organ for xenobiotic detoxification and immunological regulation, exhibits heightened sensitivity to environmental perturbations, making it a strategic biomarker organ for physiological stress studies. Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase-1 (GFPT1), the rate-limiting enzyme in the hexosamine biosynthetic pathway (HBP), governs cellular metabolism by regulating the biosynthesis of UDP-GlcNAc, an essential substrate for N-linked protein glycosylation. Through this mechanism, GFPT1 ensures the proper folding of stress-responsive chaperones and maintains endoplasmic reticulum (ER) homeostasis via the unfolded protein response (UPR). Dysregulation of GFPT1 disrupts UPR-mediated autophagy-apoptosis homeostasis, establishing its role as a master regulator of immunometabolic adaptation. Notably, *gfpt1* emerged as a hub gene in both high-temperature tolerance quantitative trait locus (QTL) mapping and transcriptomic analysis of *P. plecoglossicida*-infected *L. polyactis*, suggesting its evolutionary importance in stress resilience. To characterize *gfpt1* responses to heat stress and pathogen challenge, we successfully cloned and annotated the full-length complete coding sequence (CDS) of *L. polyactis gfpt1* via *E. coli*-based cloning, revealing a 2,049-bp CDS encoding a 682-amino acid protein with conserved PLN02981 superfamily domains critical for enzymatic activity. Phylogenetic

① Corresponding author: LIU Feng, Email: lengfeng0210@126.com

analysis demonstrated high sequence conservation (99.37% identity) with its congener, *Larimichthys crocea*, highlighting the evolutionary conservation of enzymatic function. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) analysis utilizing *β-actin* as an internal reference gene demonstrated constitutive *gfpt1* expression across all examined tissues (brain, intestine, muscle, gill, liver, kidney, spleen, skin, and heart), with expression levels in the liver being significantly higher compared to those in other organs (P<0.05), consistent with the liver's evolutionary role as a metabolic command center in teleosts. To characterize stress-specific *gfpt1* dynamics, two experimental approaches were implemented: a high-temperature challenge model comparing 32℃ heat stress versus 20℃ ambient controls, with liver sampling at 0, 6, 12, and 24 h post-exposure, and a *P. plecoglossicida*-infected model with liver sampling at 0, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h post-injection. The results showed that, under 32℃ heat stress, sustained *gfpt1* upregulation (P<0.05) was observed in liver tissue, peaking at 6 h post-exposure. However, no significant temporal differences were detected among sampling time points (6–24 h, P>0.05). In contrast, *P. plecoglossicida* infection induced dynamic *gfpt1* expression oscillations: initial downregulation at 6 h post-infection (P<0.05), followed by upregulation, which peaked at 48 h (P<0.05), transient normalization at 12, 24, and 72 h, and final downregulation at 96 h (P<0.05). These divergent expression patterns demonstrate that *gfpt1* mediates divergent molecular pathways in *L. polyactis* under abiotic (high-temperature) and biotic (pathogenic) stresses, highlighting its dual regulatory roles in stress adaptation and immune modulation. The 6 h post-exposure expression amplitude and 48 h post-infection surge establish hepatic *gfpt1* as a quantifiable biomarker for high-temperature resilience prediction and VWND outbreak alerts, respectively, providing actionable metrics for IoT-integrated aquaculture health monitoring systems. The current findings establish *gfpt1* as a biomarker for aquaculture health monitoring and thermal resilience prediction, offering critical insights into teleost stress response mechanisms and strategies for sustainable mariculture. These results provide valuable insights for addressing key challenges in *L. polyactis* aquaculture and advance our knowledge of the stress response mechanisms in marine teleosts.

Key words　*Larimichthys polyactis*; *Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase-1* (*gfpt1*); Cloning; Heat stress; *Pseudomonas plecoglossicida*