

Molecular Cloning of Black Porgy Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK)

Cheol Young Choi · *Byung Hwa Min · Pil Gue Jo · *Young Jin Chang

Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University

*Department of Aquaculture, Pukyong National University

Introduction

When fish are exposed to a stressor, activity in the hypothalamus-pituitary-interrenal axis is increased, resulting in secretion of cortisol into the blood. The primary stress responses trigger the secondary responses such as glucose increase in blood related to energy requirements. The higher glucose output stimulated by cortisol is primarily via enhanced hepatic gluconeogenic capacity, including upregulation of the key gluconeogenic enzyme, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (Hanson and Reshef, 1997). In this study, a full length black porgy cDNA was cloned and sequenced.

Materials and methods

Water increase and sources of tissue: 20 black porgy were acclimated in seawater or freshwater in four units of 40 L square circulating filter tanks with automatic temperature regulation systems, 20 fish per tank, and stabilized for 24 h. when water temperature reached 20, 25 and 30°C, with an increase in temperature of 1°C every day from 20 to 30°C, Liver, removed from the fish immediately after death, were frozen on dry ice (-79°C) and then transferred to -80°C until RNA isolation.

Rapid amplification of cDNA 3' and 5' ends (RACE): The primers were designed for RACE as follows: 5'RACE gene specific primer (5'-GSP: 5'-GAT TAC AGG GCC AGT TGT TTA CCA AGG GCT-3'), 3'RACE gene specific primer (3'-GSP: 5'-ACC TCC TGG AAG AAC AAA CCC TGG AGC -3'). PCR was carried out for 35 cycles as follows: denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 62°C for 45 s and an extension at 72°C for 90 s, followed by 1 cycle of 5 min at 72°C for extension. The PCR product was amplified, cloned into a pGEM-T Easy Vector, and sequenced.

Results and Summary

The 2563 base pair (bp) cDNA includes an open reading frame (ORF) of 1872 bp that began with the first ATG codon at position 111 bp and ended with a TAA stop codon at position 1983 bp (accession number AY929162). A comparison of the amino acid sequence of black porgy PEPCK to previously reported amino acid PEPCK sequences is shown in Fig. 1. The deduced amino acid sequence of black porgy PEPCK had the highest identity with zebrafish (*D. rerio*) PEPCK (80.2%), followed by human (*Homo sapiens*) PEPCK (75.8%) and chicken (*Gallus gallus*) PEPCK (74.7%).

```

bPEPCK 1:MPFQSQSQSQSPRYLQGLSALSFAKKEFLDANVTLCQFDSINICDSDDEERTILAQLEBQQLIKKLS 70
zPEPCK 1:HPFQSQSQSQSCPRVLDGDAASASVPEFDISVYFCQDALHEQDQEQENSTILSLEQQAIAKRA 70
hPEPCK 1:HPFQSQQLLSAKVQVQSDQSPQVAFELDANVTCQDQWIKKSDQETEGQQLQDQETELAKA 70
cPEPCK 1:KQFQKTEVNIISQVTEQDSESPQVAFETIESNAKQDQESINICDSEEEKKILDIHQDQIKKLS 70

bPEPCK 71:KTCQDQALDQDQDQAVESKTVVTFDQDQVFTPLDQVQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 140
zPEPCK 71:KTCQDQALDQDQDQAVESKTVVTFDQDQVFTPLDQVQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 140
hPEPCK 71:KTCQDQALDQDQDQAVESKTVVTFDQDQVFTPLDQVQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 139
cPEPCK 71:KTCQDQALDQDQDQAVESKTVVTFDQDQVFTPLDQVQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 139

bPEPCK 141:VYFPEQDQVPEPLKQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 210
zPEPCK 141:VYFPEQDQVPEPLKQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 210
hPEPCK 140:VYFPEQDQVPEPLKQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 209
cPEPCK 140:VYFPEQDQVPEPLKQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 209

PEPCK-specific domain
bPEPCK 211:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 280
zPEPCK 211:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 280
hPEPCK 210:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 279
cPEPCK 210:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 279

Kinase-1 Kinase-2
bPEPCK 281:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 350
zPEPCK 281:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 350
hPEPCK 280:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 349
cPEPCK 280:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 349

bPEPCK 351:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 420
zPEPCK 351:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 420
hPEPCK 350:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 419
cPEPCK 350:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 419

bPEPCK 421:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 490
zPEPCK 421:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 490
hPEPCK 420:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 489
cPEPCK 420:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 489

bPEPCK 491:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 560
zPEPCK 491:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 560
hPEPCK 490:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 559
cPEPCK 490:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 559

bPEPCK 561:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 624
zPEPCK 561:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 624
hPEPCK 560:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 622
cPEPCK 560:KQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQDQ 622

```

<Fig. 1> Amino acid sequence of black porgy PEPCK (bPEPCK)

References

Hanson, R.W. and Reshef, L., 1997. Regulation of phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression. *Ann. Rev. Biochem.* 66, 581-611.