

文章编号: 1673-1689(2010)04-0609-08

鲢鱼骨骼肌轻酶解肌球蛋白基因的 cDNA 克隆

王玲军, 陶妍*, 党静, 王孙勇

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 通过 RT-PCR 法和 3'-RACE 法从冬季和夏季鲢鱼的骨骼肌中分离到两种肌球蛋白重链同工型基因, 分别命名为低温型(sc-w)和高温型(sc-s)。两种同工型基因的 cDNA 序列包含了部分 3'-翻译区和全部 3'-非翻译区, 编码了鲢鱼轻酶解肌球蛋白(light meromyosin, LMM)羧基端的一部分氨基酸序列。在终止密码子的上游和下游区域, 两种同工型基因之间在核苷酸序列上显示了明显的差异, 其序列同源性为 79.5%, 推断的氨基酸序列的同源性为 88.1%。根据与草鱼和鲤鱼相关同工型氨基酸序列的比对结果, 发现在 15 个氨基酸残基位点上鲢鱼低温型(sc-w)与草鱼 10 °C 型(gc10)一致, 但两者显示了与其它同工型不同的变异, 并且其中的 11 个位点属高度保守性残基。这些结果似乎表明了基于低温驯化的淡水鱼表达的肌球蛋白重链同工型必须在它们的初级结构上发生某些氨基酸残基的变异才能有助于其适应低温的栖息环境, 在蛋白质水平上则展现出完全不同于高温栖息鱼类的肌球蛋白功能和性质。另一方面, 根据分子系统树的分析结果, 表明了来自相似栖息环境温度之鱼的肌球蛋白重链之间具有更近的基因距离, 进一步证明了环境温度对广温性淡水鱼肌球蛋白重链的基因歧化和功能进化的影响。

关键词: 鲢鱼; 轻酶解肌球蛋白; 同工型基因; cDNA 克隆

中图分类号: Q 785

文献标识码: A

cDNA Cloning of Silver Carp Fast Skeletal Light Meromyosin Genes

WANG Ling-jun, TAO Yan*, DANG Jing, WANG Sun-yong

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this study, two types of myosin heavy chain isoform gene were isolated from fast skeletal muscles of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) acclimatized in winter and summer by RT-PCR and 3'-RACE, and named low temperature-type (sc-w) and high temperature-type (sc-s), respectively. These two isoform genes encompassed parts of 3'-translated and entire 3'-untranslated regions and encoded amino acid sequences of the C-terminal for light meromyosin (LMM). The marked differences between sc-w and sc-s were observed in the upstream and downstream regions of the stop codon. The nucleotide and deduced amino acid sequences of these two isoforms showed 79.5% and 88.1% identities, respectively. Isoform-specific differences were clearly observed between sc-w and sc-s in 15 amino acid residues. Furthermore, among these amino acid mutations, 11 mutations occurred at the highly conserved residue sites of LMM

收稿日期: 2009-08-31

基金项目: 上海市浦江人才基金项目(06PJ14081)。

* 通信作者: 陶妍 (1961-), 女, 上海人, 农学博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究。

Email: ytao@shou.edu.cn

heavy chain from other freshwater fish belonging to Cyprinidae except for the grass carp 10 C type (gc10). These results seem to suggest that myosin heavy chain isoforms expressed in low temperature-acclimated freshwater fish require some amino acid substitutions to adapt its assembly characteristics to different environmental temperature, and subsequently reveal functional properties different from those expressed in high temperature-acclimated freshwater fish at protein level. On the other hand, phylogenetic analysis further indicated that the myosin heavy chain isoforms from fish inhabiting similar environmental temperatures have close gene distances, demonstrating the effects of temperature on genomic divergence and functional evolution of myosin heavy chains from eurythermal freshwater fish.

Key words: silver carp, light meromyosin, Isoform gene, cDNA cloning

在鱼类肌肉蛋白质的组成中,肌球蛋白约占肌原纤维蛋白的 50%以上,它主要决定了鱼肌肉蛋白质的加工适性。肌球蛋白分子含有两个相对分子质量约200 000的重链亚基和 4 个相对分子质量约 20 000的轻链亚基,每个重链的氨基端形成一个球状的头部(S1)和颈状结构(S2),余下的羧基端形成具 α -螺旋结构的被称之为轻酶解肌球蛋白(light meromyosin, LMM)的尾部;两对轻链分别非共价地结合在重链的颈部^[1]。肌球蛋白分子的头部具有 ATPase 的活性;而 LMM 具有使肌球蛋白在生理条件下形成丝状的能力,它的结构性质在很大程度上决定了鱼肌肉蛋白质的凝胶形成特性^[2]。

自从 1990 年 Gerlach 等^[3]首次报道了鲤鱼(*Cyprinus carpio*)肌球蛋白重链基因的多样性后,Kikuchi 等^[4]进一步证明了鲤鱼肌球蛋白重链属于“多基因家族”。3 种与驯化温度相关的肌球蛋白重链同工型基因从温度驯化的鲤鱼骨骼肌中被分离到,并且这些同工型基因伴随驯化温度的表达模式也被确定^[5];近年来,3 种草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肌球蛋白重链同工型基因也被分离,它们之间在 LMM 的一级结构上展现了明显的差异^[6-7]。

综观世界淡水渔业的发展,低成本、高产量的低值淡水鱼占淡水鱼总产量的 50%以上^[8]。鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)属我国淡水鱼资源中具有代表性的鱼种之一,具有低值、高产的特点,因此也是加工利用的主要对象。为了探明鲢鱼肌肉蛋白质的加工适性,对来自不同季节的鲢鱼骨骼肌肌球蛋白 Ca^{2+} -ATPase 的热稳定性和凝胶形成特性进行了测定和比较,发现春、夏季鲢鱼肌球蛋白的热稳定性明显优于秋、冬季鲢鱼的^[9,10],并且它们在凝胶形成模式上也不同^[11]。然而,迄今为止,国内外关于鲢鱼肌球蛋白分子水平上的研究报道很少。据此,作者以夏季和冬季鲢鱼为研究对

象,对编码其骨骼肌 LMM 的部分基因进行 cDNA 克隆,以期分离不同的肌球蛋白重链同工型基因,并比较不同同工型之间在 LMM 的一级结构氨基酸组成上的差异,初步探明鲢鱼肌球蛋白的功能性质发生季节性变化的分子机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲢鱼(体质量 730 g,体长 40 cm),取自上海市青浦区养殖场,于 2005 年 8 月和 2006 年 1 月购自上海市图们路农贸市场,分别作为夏季和冬季的实验材料。鲜活鲢鱼运至实验室后,用钝器击毙,立即取其背部白色骨骼肌切成 1 cm×1 cm×1 cm 见方小块,用液氮快速冻结后,保存于一 80 ℃冰箱待用。

1.2 总 RNA 提取和第一股 cDNA 合成

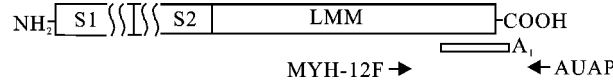
取一 80 ℃保藏的鲢鱼肌肉约 0.4 g 于 50 mL 离心管中,立即加入 Trizol 试剂(100 mg :1 mL)(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA),用高速组织捣碎机处理 2~3 min;取 1 mL 捣碎液于 1.5 mL 离心管中,28 ℃下静置 5 min,加入 0.2 mL 氯仿,来回振荡 15 s,28 ℃下放置 2~3 min;采用高速冷冻离心机离心 15 min (4 ℃,11 900 g);上清液转移至新的离心管中,加入 0.5 mL 异丙醇,28 ℃下静置 10 min,离心 10 min(条件同上);沉淀加 75% 酒精 1 mL,离心 15 min (4 ℃,≤7 500 g);弃去上清液,沉淀在铝箔上自然干燥 30 min 后,溶解于 10 μ L DEPC $\cdot$ H₂O 中,一 80 ℃保存。

第一股 cDNA 的合成使用 Super RT Kit (Invitrogen Corp)。2 μ L 总 RNA、5 μ L AP 通用引物(Adapter Primer)、2 μ L ddH₂O 混匀,70 ℃保温 10 min,冰浴 1~2 min;依次加入 4 μ L 5×First strand buffer、4 μ L dNTP mixture (2.5 mmol/L)、2 μ L DTT (0.1 mol/L),42 ℃保温 2 min,再加入 1 μ L

Reverse Transcriptase (RNase H⁻) (200 U/L) 保温 70 min; 70 ℃保温 15 min、冰上冷却后得到第一股 cDNA。

1.3 轻酶解肌球蛋白基因的 PCR 扩增

分别以冬季和夏季鲢鱼的第一股 cDNA 为模板, 通过 3'-RACE 法对编码鲢鱼肌球蛋白重链羧基端的部分轻酶解肌球蛋白基因进行扩增, 见图 1。正向引物为 MYH-12F (5'-CTGCACTCT-CAGAACAAGCCT-3'), 该引物根据鲤鱼肌球蛋白重链同工型基因的保守序列设计; 反向引物为 AUAP 通用引物 (Abridged Universal Amplification Primer) (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3')。PCR 反应体系如下: 5 μL 第一股 cDNA、各 5 μL 10 μmol/L 的正向和反向引物、2.5 μL *Ex Taq* DNA polymerase (5 U/μL) (Takara, Otsu, Japan)、10 μL 10× *Ex Tag* Buffer、16 μL dNTP Mixture, 用无菌水将反应液调至 100 μL。PCR 反应条件如下: 94 ℃预变性 4 min、94 ℃变性 30 s、59 ℃退火 1 min、72 ℃延伸 1 min、最终 72 ℃终延伸 5 min, 共进行 30 个循环。



S1 表示球状头部; S2 表示颈状区域; LMM 表示轻酶解肌球蛋白

图 1 鲢鱼部分轻酶解肌球蛋白基因的 PCR 扩增策略图
Fig. 1 Schematic representation of PCR amplification for partial light meromyosin from silver carp

1.4 序列分析

通过 PCR 扩增得到的目的片段经 DNA 纯化试剂盒(天根生物科技公司, 北京)纯化后, 与 pGM-T 质粒载体(天根生物科技公司, 北京)按 1:1 在 16 ℃下用 T4DNA 连接酶连接过夜, 然后转化感受态细胞 Top10; 通过蓝白筛选后, 采用 PCR 法进行插入检验, 每个平板挑选 8~10 个阳性克隆, 由上海生工生物工程有限公司进行 DNA 测序。采用 Chromas Version 1.62 和 BioEdit Version 7.0.5 对测序结果进行分析。

1.5 氨基酸的亲水性分析和分子系统树的构建

通过 BioEdit Version 7.0.5 软件, 根据 Hopp 等^[12]的方法对所得鲢鱼两种肌球蛋白重链同工型基因的氨基酸序列进行亲水性分析。分子系统树根据 Saitou 等^[13]提出的邻接法(Neighbor-joining method)构建。作者将鲢鱼两种同工型的部分 LMM 区域的氨基酸序列与其他鲤科鱼类和温血动物的相应序列相比较, 用 CLUSTAL W 进行多重

比对后, 通过 MEGA version 3.1^[14] 软件对获得的结果进行聚类分析, 系统树中各结点的置信度由自引导值(Bootstrap value)估计, 重复次数为 1 000。用于构建分子系统树的序列除表 1 中涉及的 3 种鲤科鱼类的各种肌球蛋白重链同工型之外, 其它的序列来自于: Cad-鸡的成熟骨骼肌(U87231)^[15]、Rperi-围产期大鼠的肌肉(X04267)^[16]、Rα-大鼠 α 心脏肌(X15938)^[17]、Rβ-大鼠 β 心脏肌(X15939)^[18]、Argo-扇贝 *Argopecten irradians* 横纹肌(X55714)^[19]、Placo-扇贝 *Placopecten magellanicus* 横纹肌(U59294)^[20]、Cgiz-鸡的胃组织(X06546)^[21]、Cnon-鸡的非肌肉组织(M26510)^[22]。

2 结果与讨论

2.1 鲢鱼肌球蛋白重链同工型基因的分离及部分轻酶解肌球蛋白基因的核苷酸序列比较

以基于冬季和夏季鲢鱼的第一股 cDNA 为模板, 均扩增得到了大约 750 bp 的 DNA 片段; 将这两个片段纯化后插入 pGM-T 质粒载体, 分别随机挑选 8~10 个阳性克隆用于测序。结果表明, 基于冬季鲢鱼的所有克隆均显示了相同的 DNA 序列, 而基于夏季鲢鱼的所有克隆亦显示了相同的 DNA 序列。但是, 这两种克隆之间在 DNA 序列上显示了明显的差异, 它们之间的核苷酸同源性的 79.5% (表 1、图 2)。前人的研究工作已经证明了哺乳动物肌球蛋白重链同工型基因之间在 3'- 和 5'- 区域会显示大的序列差异^[23]; Imai 等^[5] 和 Tao 等^[9] 分别从鲤鱼和草鱼骨骼肌中分离到的 3 种肌球蛋白重链同工型基因之间在终止密码子的上游和下游区域显示了较低的核苷酸同源性。作者从鲢鱼骨骼肌中分离到的两种 cDNA 克隆之间在终止密码子的上游和下游区域亦显示了较大的核苷酸序列差异, 据此, 可以认为这两种 cDNA 克隆代表了两个不同的肌球蛋白重链同工型基因, 它们分别被命名为低温型(sc-w)和高温型(sc-s)。Yuan 等^[24] 曾在蛋白质水平上报道了与季节温度变化相关的两种鲢鱼肌球蛋白同工型, 他们发现两种同工型之间在蛋白质的热稳定性、凝胶形成特性等方面显示了明显的差异。将鲢鱼两种 cDNA 克隆与草鱼和鲤鱼的相应核苷酸序列进行比对, 发现鲢鱼低温型(sc-w)与草鱼 10 ℃型(gc10)之间的同源性高达 96.1%、鲢鱼高温型(sc-s)与草鱼中间(gcI)和 30 ℃型(gc30)之间的同源性则较高; 另一方面, 鲢鱼高温型(sc-s)较其低温型(sc-w)与鲤鱼 3 种同工型之间显示了更高的同源性。

表 1 鲢鱼、草鱼和鲤鱼轻酶解肌球蛋白 cDNA 克隆的核苷酸序列及推断的氨基酸序列的同源性

Tab. 1 DNA nucleotide and deduced amino acid sequences identities between light meromyosin cDNA clones isolated from silver carp and those of grass carp and common carp

cDNA 克隆	核苷酸和氨基酸序列的同源性/%						
	sc-s	gc10 ^a	gc1 ^a	gc30 ^a	cc10 ^b	cc1 ^b	cc30 ^b
sc-w	79.5 ^c (88.1) ^d	96.1 (97.2)	80.0 (88.5)	79.2 (88.5)	77.9 (85.8)	78.4 (87.1)	78.6 (89.4)
sc-s		79.1 (87.6)	96.6 (96.8)	91.6 (94.9)	91.1 (90.8)	92.1 (91.7)	88.7 (94.9)
gc10			80.2 (88.5)	79.2 (88.5)	77.8 (85.8)	78.6 (87.6)	78.6 (88.5)
gc1				93.6 (97.2)	93.2 (93.1)	94.2 (94.0)	90.3 (95.8)
gc30					89.6 (91.3)	90.4 (92.2)	92.8 (94.9)
cc10						96.4 (96.3)	89.2 (92.6)
cc1							90.0 (93.6)

sc-w、sc-s 代表两种鲢鱼肌球蛋白重链同工型基因；gc10、gc1 和 gc30 代表 3 种草鱼肌球蛋白重链同工型基因；cc10、cc1 和 cc30 代表鲤鱼三种肌球蛋白重链同工型基因。a、引自 Tao 等^[6]；b、引自 Imai 等^[5]；c、核苷酸同源性；d、氨基酸同源性

sc-w	CTGACCTCTGAGACGACGCTTATACACCAAGAGAGCTGACCTGACCTGTTCTATGTCAGAGTGAATGA	80
sc-s	T..G..C..GA..T..AG...G..G..	80
gc10	T..C..G..G.....A.....C.....	80
gc1	A..A..T.....T.....T..G..C..G..T..AG...G..G..	80
gc30	A..A..T.....T.....T..G..C..G..T..AG...G..G..	80
cc10	A..A..T.....G.....A..T..G..C..G..T..AG...G..G..	80
cc1	A..A..T.....T.....A..T..GC..G..T..AG...G..G..	80
cc30	A..A..T.....T.....T..G..C..G..T..AG...G..G..	80
sc-w	TGACACATACAGAACCCAGAAATGACAGAGAGAGAGAGAGGACCTACTGAGCTGTCATGATGACAGAGAGC	160
sc-s	T.....C.....G.....G.....C.....TA.....T..G.....	160
gc10	T.....C.....G.....G.....C.....TA.....T..G.....	160
gc1	T.....C.....G.....G.....C.....TA.....T..G.....	160
gc30	T.....C.....G.....G.....C.....TA.....T..G.....	160
cc10	T.....C.....G.....G.....C.....TA.....T..G.....	160
cc1	T.....C.....G.....G.....C.....TA.....T..G.....	160
cc30	T.....C.....G.....G.....C.....TA.....T..G.....	160
sc-w	TCAGAGAGACAGAGACGACCTCTGACCTGAGAGATGAGAGAGATCTGAGCTGACATGAGAGACTGACAC	240
sc-s	G.....G.....G.....G.....C.....G.....T..C..AC.....	240
gc10	G.....G.....G.....G.....C.....G.....T..C..A.....	240
gc1	G.....G.....G.....G.....C.....G.....T..C..A.....	240
gc30	G.....G.....G.....G.....C.....G.....T..C..A.....	240
cc10	G.....G.....G.....G.....C.....G.....T..C..A.....	240
cc1	G.....G.....G.....G.....C.....G.....T..C..A.....	240
cc30	G.....G.....G.....G.....C.....G.....T..C..A.....	240
sc-w	CGTCTGATGAGCTGAGAGATGACAG	320
sc-s	A.....G.....T.....G.....T.....G.....C.....T.....	320
gc10	A.....G.....T.....G.....T.....G.....C.....T.....	320
gc1	A.....G.....T.....G.....T.....G.....C.....T.....	320
gc30	A.....G.....T.....G.....T.....G.....C.....T.....	320
cc10	A.....G.....T.....G.....T.....G.....C.....T.....	320
cc1	A.....G.....T.....G.....T.....G.....C.....T.....	320
cc30	A.....G.....T.....G.....T.....G.....C.....T.....	320
sc-w	TGACACTGAGTGAAGACAG	400
sc-s	A.....T.....T.....T.....A.....C.....G.....A.....G.....G.....G.....G.....	400
gc10	C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	400
gc1	A.....T.....T.....T.....T.....A.....C.....G.....A.....G.....G.....G.....G.....	400
gc30	A.....T.....T.....T.....T.....T.....A.....C.....G.....A.....G.....G.....G.....G.....	400
cc10	G.....G.....T.....T.....T.....T.....T.....A.....C.....G.....A.....G.....G.....G.....	400
cc1	G.....G.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....A.....C.....G.....A.....G.....G.....	400
cc30	G.....G.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....A.....C.....G.....A.....G.....	400
sc-w	AGCTCACTTATCAGACTGAG	480
sc-s	C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	480
gc10	C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	480
gc1	C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	480
gc30	C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	480
cc10	C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	480
cc1	C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	480
cc30	C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	480
sc-w	AAAGTCTACAG	560
sc-s	G.....T.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	560
gc10	G.....T.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	560
gc1	G.....T.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	560
gc30	G.....T.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	560
cc10	G.....T.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	560
cc1	G.....T.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	560
cc30	G.....T.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	560
sc-w	GCTGAG	640
sc-s	G.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	640
gc10	G.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	640
gc1	G.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	640
gc30	G.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	640
cc10	G.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	640
cc1	G.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	640
cc30	G.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....	640
sc-w	AGGCAAG	715
sc-s	AGT.....GA.....G.....G.....AA.....CC..CA.....CC.....AGAG..G.....G.....TAC..T.....	715
gc10	T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	715
gc1	AGT.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	715
gc30	AG.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	715
cc10	A.....T.....T.....G.....G.....AA.....CT.....CA.....AGAG..G.....G.....C.....AC..T.....CT	706
cc1	A.....T.....T.....G.....G.....AA.....CA.....AGAG..G.....G.....C.....AC..T.....CT	706
cc30	AG.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	716
sc-w	AAGG--GACCTTCTGATTAACCTGAG	750
sc-s	G.....GTT..T..G.....GTT.....A.....G.....C.....AGC.....AG.....G.....TAC..T.....T	746
gc10	G.....GTT..T..G.....GTT.....A.....A.....T.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	746
gc1	G.....GTT..T..G.....GTT.....A.....A.....T.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	746
gc30	GTTT..T..A.....GTTT.....T.....C.....T.....C.....AAGAG.....	753
cc10	G.....GTTT..T..G.....GTTT.....T.....C.....G.....G.....T.....G.....G.....G.....	740
cc1	G.....GTTT..T..G.....GTTT.....T.....T.....GAG..AT.....AT..G.....	742
cc30	GTTT..T..TATA..ATTC.....T.....AC..GT.....CTGAGAGCA.....	754

阴影表示终止密码子；方框表示 poly(A) 信号；箭头表示引物位置
鲢鱼、草鱼和鲤鱼部分轻酶解肌球蛋白基因的核苷酸序列比较

Fig. 2 The comparison in the nucleotide sequences of partial light meromyosin genes from silver carp and those of grass carp and common carp

2.2 鲢鱼部分轻酶解肌球蛋白的氨基酸组成分析

根据编码鲢鱼两种肌球蛋白重链同工型的部分轻酶解肌球蛋白的 cDNA 序列推断其氨基酸序列，并进行比对，同时与草鱼和鲤鱼的相应氨基酸序列进行比较。结果显示，sc-w 与 sc-s 的氨基酸同源性仅为 88.1%，见表 1；sc-w 与 gc10 之间显示了 97.2% 的最高同源性。而 sc-s 与 gc1 和 gc30 之间显示较高的同源性，分别为 96.8% 和 94.9%，与 cc30 显示 94.9% 的同源性。根据 Tao 等^[6]的报道，gc1 也是从 30℃ 驯化的草鱼骨骼肌中分离到的。另外，sc-w、gc10 和 cc1 的氨基酸序列较其它同工型的氨基酸序列均缩短了一个氨基酸残基，见图 3。根据 Imai 等^[5]的报道，cc1 不同于 gc1，它主要是从 10℃ 驯化的鲤鱼骨骼肌中分离到的。结果似乎表明了来自于相似温度环境的淡水鱼在肌球蛋白重链的结构上更具有相似性。然而，sc-w 与鲤鱼的 cc10 之间反而显示了较之与 cc1 和 cc30 之间略低的氨基酸同源性，此结果亦出现在草鱼 3 种与鲤鱼 3 种全长 LMM 同工型的氨基酸比对中^[7]，可能与 cc10 的基因歧化有关，此推测被以下的分子系统树进一步证明。

由图 3 的阴影部分可以发现，sc-w 和 gc10 在 His-21、Ser-24、Thr-29、Leu-49、Ser-62、Asn-87、Asp-140、Ala-147、Ser-167、Gly-176、Tyr-177、Lys-180、Leu-181、Glu-192、Glu-217 的氨基酸残基位点上显示了与其它同工型不同的特有变异，并且其中 His-21、Ser-24、Leu-49、Ser-62、Asn-87、Asp-140、Ser-167、Gly-176、Tyr-177、Lys-180、Leu-181 显示了高度的保守。根据 Hopp 等的方法^[12]，对两种鲢

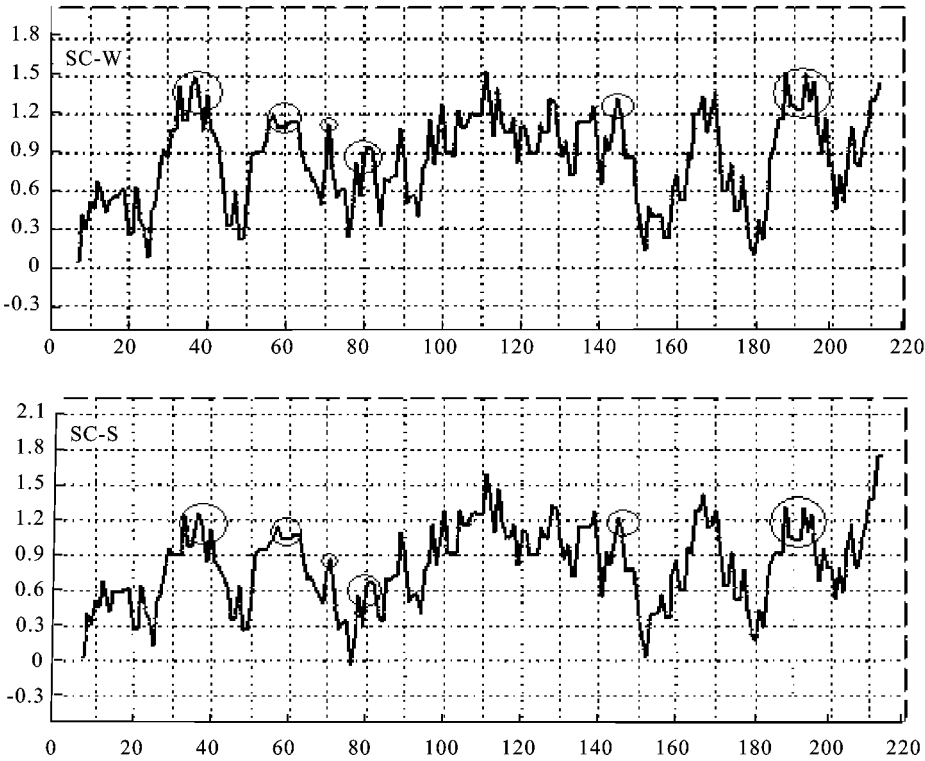
鱼同工型的部分轻酶解肌球蛋白的氨基酸序列进行亲水性分析, 结果见图 4。两种同工型的氨基酸基本都显示了亲水性模式。然而, 这两种同工型的氨基酸的亲水周期还是有些明显的不同, 比如 sc-w

相对于 sc-s 在第 31-43、55-58、68-70、79-87、141-145 和 189-195 的氨基酸区域展示了更高的亲水性。

sc-w	LHSQNTSLINTKKLEADLVHVQSEVDDTVQEARNAEEKAKKAITDAALMAEELKKEQDTS	SHLERMKKNLEVTVKDLQH	80
sc-s	QI.G.....S.....G.....M.....A.....H.....		80
gc10	L.....I.....G.....M.....A.....		80
gcI	Q.....G.....S.....M.....A.....		80
gc30	Q.....G.....S.....V.....G.....M.....A.....R.....		80
cc10	S.....T.....Q.....G.....A.....M.....A.....M.L.....		80
ccI	T.....LQ.....G.....A.....M.....A.....M.....		80
cc30	Q.....G.....A.....M.....A.....		80
sc-w	RIDEAENLAMKGGKKQLQKLESRVRELEEVEAEQRRGADAVKGVKRYERRVKELTYQTD	EDKKNVARLQDLVDKLQLKV	160
sc-s	S.....S.....S.....E.....I.....		160
gc10	P.....		160
gcI	S.....S.....E.....T.....		160
gc30	S.....S.....E.....T.....		160
cc10	S.....H.....A.....-.....E.....T.....N.....		159
ccI	S.....H.....A.....E.....S.T.....		160
cc30	S.....A.....E.....I.....		160
sc-w	KVYKRQSEEAEEQANGYLSKLRKVQHELEEAERADISESQVNKLVRKSRDAGKAKEG-	218	
sc-s	S.....A.....TH.RY.....Q.....A.....EV.S.DEE	219	
gc10	A.....A.....V.E-	218	
gcI	A.....A.S.....TH.RY.....Q.....A.....A.....EV.S.DEE	219	
gc30	A.....A.S.....TH.RY.....Q.....A.....S.DEE	219	
cc10	A.....A.....TH.RY.....SH.....A.....A.....E.....T.VEE	218	
ccI	A.....A.....TH.RY.....SH.....A.....A.....E.....T.DE-	218	
cc30	A.....T.....TH.RY.....Q.....VA.....A.....S.DEE	219	

阴影表示 sc-w 和 gc10 变异的氨基酸残基; 星号表示保守的氨基酸残基
图 3 鲢鱼、草鱼和鲤鱼部分轻酶解肌球蛋白的氨基酸序列比较

Fig 3 The comparison in the deduced amino acid sequences of partial light meromyosins from silver carp and those of grass carp and common carp



圈表示 sc-w 与 sc-s 之间存在亲水性差异的区域

图 4 鲢鱼两种肌球蛋白重链同工型基因部分轻酶解肌球蛋白氨基酸序列的亲水性分析

Fig 4 Hydrophilicity analysis of partial deduced amino acid sequences for light meromyosin from the two types of silver carp myosin heavy chain isoform

我们已经在蛋白质水平上通过差示扫描量热仪(DSC)和流变仪对冬季和夏季鲢鱼的肌球蛋白热稳定性和凝胶形成特性进行了测定,发现前者的热稳定性明显低于后者,且两者之间在凝胶形成模式上显示了明显的差异^[11];Tao 等²⁵⁻²⁹报道了 10℃驯化和冬季草鱼的肌球蛋白热稳定性较 30℃驯化和夏季草鱼的明显要低,彼此之间亦显示了不同的凝胶形成模式。据此,可以认为不同肌球蛋白重链同工型在轻酶解肌球蛋白特定区域氨基酸残基上的变异可能导致它们之间在结构上的差异,进而引起功能性质上的变化。这样,似乎基于低温驯化的淡水鱼表达的肌球蛋白重链同工型必须在它们的初级结构上发生某些氨基酸残基的变异才能有助于其适应低温的栖息环境。

2.3 分子系统树分析

我们根据 3 种鲤科鱼类和两种温血动物的骨骼肌、心脏肌或非肌肉组织的部分 LMM 氨基酸序列构建了分子系统树。由图 5 所示,系统树分为 3 个主要的分支:一个最大的分支由草鱼、鲢鱼和鲤

鱼的骨骼肌、温血动物鸡的成年骨骼肌以及大鼠的心脏肌的肌球蛋白重链同工型组成,其自引导值为 99%;另两个分支分别由非脊椎动物的扇贝肌和鸡的非肌肉组织的肌球蛋白重链同工型组成,它们的自引导值均为 100%。在大分支中,3 种鲤科鱼类的 8 个肌球蛋白重链同工型形成了一个组,其中,gcI、gc30、sc-s 和 cc30 均从高温栖息的鱼肌肉中分离,因此,它们之间显示了更近的基因距离;而 ccI、sc-w、gc10 均从低温栖息的鱼肌肉中分离,它们之间则显示了近的基因距离。虽然 cc10 也是来自于低温驯化的鲤鱼,但在这个大组中,它形成了独立于其它类型的分支,其自引导值为 72%。来自于鸡的非肌肉组织的肌球蛋白重链同工型与所有其它来自于骨骼肌的肌球蛋白重链同工型之间显示了低的同源性。分子系统树的分析结果进一步证明了广温性淡水鱼肌球蛋白重链的基因歧化和功能进化在很大程度上受栖息环境温度影响。这些结果完全符合了前人报道的对鲤鱼和草鱼所作的相关分析结果^[7, 27]。

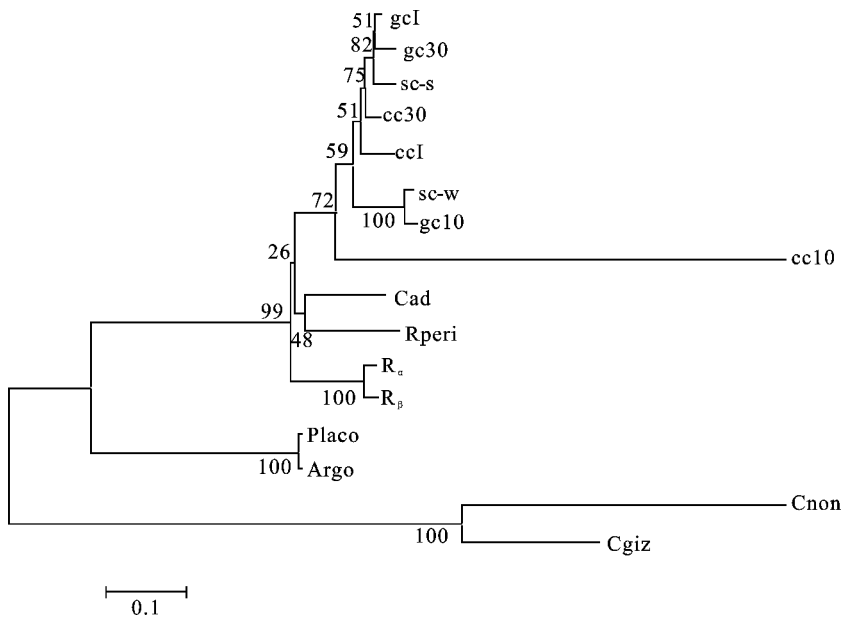


图 5 根据鲢鱼和其它生物的轻酶解肌球蛋白氨基酸序列构建的分子系统树

Fig. 5 Phylogenetic analysis based on the amino acid sequences of partial light meromyosins from silver carp and those of other species

3 结 语

作者通过 RT-PCR 法和 3'-RACE 法从冬季和夏季鲢鱼的骨骼肌中分别分离到一种低温型(sc-w)和一种高温型(sc-s)肌球蛋白重链同工型基因,两种同工型基因的 cDNA 序列包含了部分 3'-翻译区

和全部 3'-非翻译区,编码了鲢鱼轻酶解肌球蛋白(LMM)羧基端的一部分氨基酸序列。两种同工型之间的核苷酸或氨基酸序列之间显示了较低的同源性;与草鱼和鲤鱼的各种同工型之间的比对结果,基本上显示了来自低温和高温栖息环境的鱼其各自肌球蛋白重链同工型之间具有更高的同源性,

表明了广温性的淡水鱼必须在它们的肌球蛋白重链的初级结构上发生某些氨基酸残基的变异才能有助于其适应低温的栖息环境。分子系统树的分

析结果进一步证明了淡水鱼肌球蛋白重链同工型的基因距离与它们所栖息的环境温度有关。

参考文献(References):

- [1] Harrington W F, Rodgers M E. Myosin [J]. **Annu Rev Biochem**, 1984, 53: 35—73.
- [2] Sano T, Noguchi S F, Matsumoto J J, et al. Thermal gelation characteristics of myosin subfragments [J]. **J Food Sci** 1990, 55 (1): 55—58.
- [3] Gerlach G, Turay L, Malik T A, et al. Mechanism of temperature acclimation in the carp: a molecular approach [J]. **Am J Physiol** 1990, 259: 237—244.
- [4] Kikuchi K, Muramatsu M, Hirayama Y, et al. Characterization of the carp myosin heavy chain multigene family [J]. **Gene**, 1999, 228, 189—196.
- [5] Imai J I, Hirayama Y, Kikuchi K, et al. cDNA cloning of myosin heavy chain isoforms from and their gene expression associated with temperature acclimation [J]. **J Exp Biol**, 1997, 200, 27—34.
- [6] Tao Yan, Kobayashi M, Liang C S, et al. Temperature-dependent expression patterns of grass carp fast skeletal myosin heavy chain genes [J]. **Comp Biochem Physiol**, 2004, B139: 649—656.
- [7] Wang Sun Yong, Tao Yan, Liang C S, et al. cDNA cloning and characterization of temperature-acclimation-associated light meromyosins from grass carp fast skeletal muscle [J]. **Comp Biochem Physiol**, 2008, B149: 378—387.
- [8] 张 h, 张骏. 国内外低值淡水鱼加工与下脚料利用的研究进展 [J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25 (5): 115—120.
ZHANG Min, ZHANG Jun. A research review of low value freshwater fishes processing and their discards utilization [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25 (5): 115—120. (in Chinese)
- [9] 韩黎, 陶妍, 汪之和. 淡水鱼肌球蛋白 Ca^{2+} -ATPase 热稳定性的季节变化 [J]. 上海水产大学学报, 2007, 16 (4): 362—367.
HAN Li, TAO Yan, WANG Zhi-he. Seasonal changes in thermal stability of Ca^{2+} -ATPase for myosins from freshwater fish [J]. **Journal of Shanghai Fisheries University**, 2007, 16 (4): 362—367. (in Chinese)
- [10] 韩黎, 陶妍, 汪之和. 草鱼和鲢鱼肌球蛋白 Ca^{2+} -ATPase 热力学活化参数的季节变化 [J]. 水生生物学报, 2008, 32 (2): 22—27.
HAN Li, TAO Yan, WANG Zhi-he. Seasonal changes in thermodynamic activation parameters of myosin Ca^{2+} -ATPase from grass carp and silver carp [J]. **Acta Hydrobiologica Sinica**, 2008, 32 (2): 22—27. (in Chinese)
- [11] 董永, 陶妍. 淡水鱼骨骼肌肌球蛋白热稳定性及凝胶特性的季节变化 [J]. 食品工业科技, 2008, 29 (7): 124—127.
DONG Yong, TAO Yan. Seasonal changes in thermal stability and gel-forming property of myosin from grass carp fast skeletal muscle [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2008, 29 (7): 124—127. (in Chinese)
- [12] Hopp T P, Woods K R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences [J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1981, 78: 3824—3828.
- [13] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. **Mol Biol Evol** 1987, 4: 406—425.
- [14] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. **Briefings in Bioinformatics**, 2004, 5: 150—163.
- [15] Chao T H, Bandman E. Cloning, nucleotide sequence and characterization of a full-length cDNA encoding the myosin heavy chain from adult chicken pectoralis major muscle [J]. **Gene**, 1997, 199(1-2): 265—270.
- [16] Karsch-Mizrachi I, Feghali R, Shows T B, et al. Generation of a full-length human perinatal myosin heavy-chain-encoding cDNA [J]. **Gene**, 1990, 89: 289—294.
- [17] McNally E M, Gianola K M, Leinwand L A. Complete nucleotide sequence of full length cDNA for rat alpha cardiac myosin heavy chain [J]. **Nucleic Acids Res**, 1989, 17: 7527—7528.
- [18] Kraft R, Bravo-Zehnder M, Taylor D A, et al. Complete nucleotide sequence of full length cDNA for rat beta cardiac myosin heavy chain [J]. **Nucleic Acids Res**, 1989, 17: 7529—7530.

[19] Nyitray L, Goodwin E B, Szent-Gyorgyi A G. Nucleotide sequence of full length cDNA for a scallop striated muscle myosin heavy chain [J] . **Nucleic Acids Res** 1990, 18: 7158.

[20] Perreault-Micale C, Kalabokis V, Nyitray L, et al. Sequence variations in the surface loop near the nucleotide binding site modulate the ATP turnover rates of molluscan myosins [J] . **J Muscle Res Cell Motil**. 1996, 17: 543—553.

[21] Yanakisawa M, Hamada Y, Katsuragawa Y, et al. Complete primary structure of vertebrate smooth muscle myosin heavy chain deduced from its complementary DNA sequence. Implications on topography and function of myosin [J] . **J Mol Biol** 1987, 198: 143—157.

[22] Shohet R V, Conti M A, Kawamoto S, et al. Cloning of the cDNA encoding the myosin heavy chain of a vertebrate cellular myosin [J] . **Proc Natl Acad Sci USA** 1989, 86: 7726—7730.

[23] Weiss A. The mammalian myosin heavy chain gene family [J] . **Annu Rev Cell Dev Biol** 1996 12: 417—439.

[24] Yuan C, Kaneniwa M, Wang X, et al. Seasonal expression of two types of myosin with different thermostability in silver carp muscle (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J] . **J Food Sci** 2005, 70: C326—C331.

[25] Tao Yan, Kobayashi M, Fukushima H, et al. Changes in enzymatic and structural properties of grass carp fast skeletal myosin induced by the laboratory-conditioned thermal acclimation and seasonal acclimatization [J] . **Fish Sci** 2005, 71: 195—204.

[26] Tao Yan, Kobayashi M, Fukushima H, et al. Changes in rheological properties of grass carp fast skeletal myosin induced by seasonal acclimatization [J] . **Fish Sci** 2007, 73: 189—196.

[27] Nihei Y, Kobiyama A, Ikeda D, et al. Molecular cloning and mRNA expression analysis of carp embryonic, slow and cardiac myosin heavy chain isoforms [J] . **J Exp Biol** 2006, 209: 188—198.

(责任编辑:李春丽)

《食品与生物技术学报》征稿、征订启事

《食品与生物技术学报》(双月刊)是教育部主管、江南大学主办的有关食品科学与工程、生物技术与发酵工程及其相关研究的专业性学术期刊,为 CSCD 核心期刊、全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国期刊方阵双效期刊,目前被美国化学文摘(CA)等国内外 10 余家著名检索系统收录。主要刊发食品科学与工程,食品营养学,粮食、油脂及植物蛋白工程,制糖工程,农产品及水产品加工与贮藏,动物营养与饲料工程,微生物发酵,生物制药工程,环境生物技术等专业最新科研成果(新理论、新方法、新技术)的学术论文,以及反映学科前沿研究动态的高质量综述文章等,供相关领域的高等院校、科研院所、企事业单位的教学、科研等专业技术人员、专业管理人员以及有关院校师生阅读,热忱欢迎广大读者订阅。

《食品与生物技术学报》,双月刊,A4(大 16K)开本,160 页,全年 6 期,每册定价 15.00 元,邮发代号:28—79,全国各地邮局均可订阅。

《食品与生物技术学报》编辑部