

鲢鱼骨骼肌肌球蛋白重链基因的 cDNA 克隆与表达

党 静 陶 妍 王孙勇 鲍其玲

(上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

cDNA CLONING AND EXPRESSION OF SILVER CARP FAST SKELETAL MYOSIN HEAVY CHAIN GENES

DANG Jing, TAO Yan, WANG Sun-Yong and BAO Qi-Ling

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

关键词: 鲢鱼; 肌球蛋白重链; 同工型基因; cDNA 克隆; RT-PCR

Key words: Silver carp; Myosin heavy chain; Isoform gene; cDNA cloning; RT-PCR

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)01-0215-05

肌球蛋白分子含有 2 个约 200 kD 的重链亚基和 4 个约 20 kD 的轻链亚基, 重链亚基由球状的头部(S1)和 α -双螺旋的杆部(Rod)组成^[1]。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, 并且其基因在生物进化过程中的变异性很大, 以致肌原纤维蛋白性质的变化主要是由肌球蛋白的变化引起的^[2]。

Johnston, *et al.*^[3]提出了栖息于不同环境温度下的海水鱼类, 其肌肉肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 的热稳定性是不同的; Wang, *et al.*^[4]在国内首次报道了季节温度变化对我国几种主要淡水鱼肌原纤维蛋白 Ca^{2+} -ATPase 热稳定性的影响。在过去的十几年中, 日本研究者对实验室人工温度驯化的鲤鱼(*Cyprinus carpio*)肌球蛋白展开了大量的研究, 证明了鲤鱼肌球蛋白热稳定性的变化与其重链初级结构的变化有关, 进而与肌球蛋白重链同工型基因的表达有关^[2,5-7]。Imai, *et al.*^[6]在鲤鱼骨骼肌中分离到 3 种与驯化温度相关的肌球蛋白重链同工型基因, 分别命名为 10℃型、中间型和 30℃型。近年来从不同温度驯化的草鱼骨骼肌中亦分离到了 3 种肌球蛋白重链同工型基因^[8]。这些同工型基因之间在 3'-非翻译区域的核苷酸序列显示了明显的差异。

鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)是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。众所周知, 包括鲢、鳙、草、青四大家鱼在内的大部分淡水鱼与鲤鱼一样属于广温性的鱼类, 它们肌肉蛋白质的功能性质可能也会伴随栖息环境温度的变化而变化。近来, 我们已经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。然而, 迄今为止, 国内外尚未见关于鲢鱼肌球蛋白分子水平上的研究报道。据此, 本文首先以不同季节的鲢鱼为研究对象, 对编码其骨骼肌肌球蛋白重链的基因进行 cDNA 克隆, 以期分离不同的肌球蛋白重链同工型基因; 然后通过半定量 RT-PCR 法考察不同同工型基因在季节驯化鲢鱼肌肉中的表达模式, 旨在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

鲢鱼来自于上海市青浦区养殖场, 于 2005 年 8 月和 11 月、2006 年 1 月和 4 月购自上海市图们路农贸市场, 分别作为夏、秋、冬、春季的实验材料。鱼平均体重 730 g, 平均体长 40 cm。每种季节的鱼均取 3—4 条, 迅速敲击其

收稿日期: 2008-07-30, 修订日期: 2009-06-12

基金项目: 上海市科委浦江人才基金项目(06PJ14081)资助

作者简介: 党静(1981—), 女, 汉族, 河北保定人; 硕士研究生; 主要从事水产生物资源利用方面的研究。E-mail: jdang4601@126.com

通讯作者: 陶妍(1961—), 女, 汉族, 上海市人; 教授, 博士; 主要从事水产生物化学和生物技术方面的研究。E-mail: ytao@shou.

edu.cn

头部致其死亡,取背部适量骨骼肌肌肉于液氮中迅速冻结,置于-80℃冰箱中备用。

1.2 RT-PCR 和 3'-RACE 法

采用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司,美国)分别从 1 月(冬季)和 8 月(夏季)的鲢鱼骨骼肌中提取总 RNA,第一链 cDNA 的合成使用 Superscript RT Kit(天根生物科技公司,北京),使用的引物是带有 oligo-dT 的通用引物 AP。以第一链 cDNA 为模板,使用通用的反向引物 AUAP(5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3')和正向的特异性引物 MHY-3F(5'-GCACCGTCTGGATGAGGCTGA-3')进行 PCR 扩增。MHY-3F 是根据鲤鱼肌球蛋白重链同工型基因的保守序列设计的^[6]。反应体系为:第一链 cDNA 模板 5 μL、10 μmol/L 的正向和反向引物各 5 μL、2×Taq PCR Master Mix(天根生物科技公司,北京)50 μL,最后用无菌水将体积调至 100 μL。PCR 的反应条件为:94℃预变性 4min、94℃变性 30s、59℃退火 1min、72℃延伸 1min、最终 72℃终延伸 10min,反应共进行 30 个循环。

1.3 序列分析

PCR 扩增的目的片段经 1%琼脂糖凝胶电泳后,进行割胶纯化,与 pGM-T 质粒载体(天根生物科技公司,北京)按 1:1 在 16℃下用 T₄ DNA 连接酶连接过夜,并转化感受态细胞 Top10。将转化菌接种于含 X-gal、IPTG、100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂皿,37℃培养过夜;挑取白色菌落,通过 PCR 法进行插入检验,分别挑选 8—10 个阳性克隆于 LB 培养液中,37℃培养过夜,送上海生工生物工程公司测序。通过 Chromas Version 1.62 和 BioEdit Version 7.0.5 对测序结果进行分析。

1.4 半定量 RT-PCR 法考察肌球蛋白重链同工型基因的表达

从春、夏、秋、冬四个季节的鲢鱼骨骼肌中分别提取总 RNA、合成第一链 cDNA,并调整它们的浓度保持一致。在分离获得低温型(sc-w)和高温型(sc-s)两种鲢鱼肌球蛋白重链同工型基因的基础上,以两者 3'-端的 DNA 序列差异为依据,确定用作反向特异性引物的序列,sc-w 和 sc-s 的反向引物分别为 sc-wR(5'-CTTCAGTAAATGCT-CCTTTCAAGTTTTAA-3')和 sc-sR(5'-AATGGACACAG-AAAAACTCAACACAAGT-3');正向引物均为 MHY-3F。另外,以鲢鱼 β -actin 为内标,其正向和反向引物的序列分别为 5'-TCGGTATGGGACAGAAGGACA-3'和 5'-ATACAGGGACAGCACAGCCT-3'。然后以来自四种季节的鲢鱼第一链 cDNA 为模板,分别采用上述引物进行 PCR 扩增,反应体系为:10×Taq buffer 2 μL,2.5 mmol/L dNTP 1.6 μL,10 μmol/L 的正向和反向引物各 0.8 μL,第一链 cDNA 0.5 μL,Taq 酶 0.3 μL,最后用无菌水调至总体积 20 μL。反应条件如下:94℃预变性 4min、94℃变性 30s、58℃退火 30s、72℃延伸 1min、72℃终延伸 10min,反应共进行 30 个循环。对所有 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶

电泳,通过 Panasonic wv-BP330 凝胶成像仪对图像进行分析和记录。

2 结果与讨论

2.1 鲢鱼骨骼肌肌球蛋白重链同工型基因的分离

以基于冬季和夏季鱼的第一股 cDNA 为模板,通过 3'-RACE 法分别扩增得到了分子量大约 510 bp 的 DNA 片段;将这 2 个片段纯化后插入载体,各随机挑选 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(图 1)。

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'-非翻译区域会显示大的序列差异^[11]。本文从鲢鱼骨骼肌中初步分离到的这两种 cDNA 克隆之间在终止密码子的上游和下游区域亦显示了很大的核苷酸序列差异,据此,我们认为这两种 cDNA 克隆代表了两个不同的肌球蛋白重链同工型基因,并将它们分别命名为低温型(sc-w)和高温型(sc-s)。Yuan, *et al.*^[12]曾在蛋白质水平上报道了与季节温度变化相关的两种具有不同热稳定性的鲢鱼肌球蛋白同工型。本文的结果与 Tao, *et al.*^[8]和 Imai, *et al.*^[6]从草鱼和鲤鱼骨骼肌中分离到的三种类型的 cDNA 克隆的情况相类似。

2.2 两种肌球蛋白重链同工型基因的核苷酸及氨基酸序列分析

通过对获得的两种鲢鱼 cDNA 克隆以及草鱼和鲤鱼的肌球蛋白重链同工型基因的相应核苷酸序列进行比对(图 1、表 1),结果显示,鲢鱼低温型(sc-w)与草鱼 10℃型(gc10)之间有最高的序列同源性(98.8%)、与草鱼中间型(gcI)和 30℃型(gc30)的同源性分别为 76.6%和 76.7%,而与鲤鱼三种同工型的序列同源性则较低(70.0%—74.3%)。另一方面,鲢鱼高温型(sc-s)与草鱼中间型(gcI)和 30℃型(gc30)之间显示了 90%以上的序列同源性、与鲤鱼三种同工型之间的同源性在 81%左右。然而,鲢鱼低温型(sc-w)与高温型(sc-s)之间仅显示了 75.3%的序列同源性。根据鲢鱼两种肌球蛋白重链同工型的 cDNA 序列,进一步推断它们的氨基酸序列,并与草鱼和鲤鱼的相应氨基酸序列进行了比对,显示的同源性结果与核苷酸序列的比对结果基本上趋势是一致的,只是鲢鱼低温型(sc-w)、草鱼 10℃型(gc10)和鲤鱼中间型(ccI)的氨基酸序列较其他同工型的氨基酸序列均缩短了一个氨基酸残基(图 2、表 1)。根据文献[6],鲤鱼中间型主要是从 10℃驯化的鲤鱼骨骼肌中分离到的。另外,由图 2 的阴影部分可以发现,鲢鱼低温型(sc-w)和草鱼 10℃型(gc10)在 Asn-8、Asp-61、Ser-88、Gly-97、Tyr-98、Lys-101、Leu-102 的氨基酸残基位点上显示了与其他同工型不同的特有变异。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

sc-W	GCACCGTCTGGATGAGGCTGAGAATCTGGCCATGAAGGGAGAAAGAAAACAACCTCAGAAAACTGGAGTGCCAGAGTTTCGTG	80
sc-S	. . A . G . . . T . . . G . T . . . G . . G . C .	80
gc10	.	80
gcI	A . G . . . T . . . G . . . G . . G .	80
gc30	A . G . . . T . . . G . . . G . . G .	80
cc10	G . . . T . . . G . . . G . . G . A .	80
ccI	G . . . T . . . G . . . G . . G . A .	80
cc30	G . . . T . . . G . . . G . . G .	80
sc-W	AGCTTGAGACTGAAGTTGAAGCAGAGCAGAGACGTGGAGCCGATGCTGTTAAGGGTGTCGCCAAATATGAGAGGAGAGTG	160
sc-S	. T . A . . T . . . A . . . T . . . T . A . C . . . G . A . A . G . . . C G . .	160
gc10	.	160
gcI	. T . A . . T . . . T . . . T . A . C . . . G . A . A . G G . .	160
gc30	. T . A . . T . . . T . . . T . A . C . . . G . A . A . G C . . . G . .	160
cc10	. T . G . AG T . A T . A . C . . . G . A . A . G A	160
ccI	. T . G . . G T . A T . A . C . . . G . A . A . G A	160
cc30	. T . G . . G G . A T . A G . A . A . G A	160
sc-W	AAAGAGCTCACTTATCAGACTGACGAGGACAAGAAGAAGCTCGCCAGACTCCAGGATCTGGTTGATAAACTGCAGCTGAA	240
sc-S	. . G C . C . . . G . A T . GAT . C . . . G A . C . G .	240
gc10	.	240
gcI	. . G C . C . . . G . A GA . C . . G A . C . G .	240
gc30	. . G C . C . . . G . A GA . C . . G A . C . G .	240
cc10	. . G C . C . . . G . A GA TC . C . G A . C . C .	240
ccI	. . G C . C . . . C . G . A GT . GA TC . G A . C . G .	240
cc30	. . G C . C . . . G . A GAT . C . C . G A . C . G .	240
sc-W	GGTCAAAGTCTACAAGCGGCAGTCTGAAGAGGCAGGAGCAAGCCAATGGTTACCTGTCCAAGTTGAGGAAGGTGCAGC	320
sc-S	A . G . GTC C . G . . . A . T G . . . CAC . C . . . G . AC	320
gc10	 C A	320
gcI	A . G . G . C C . G . . . AT . T G . . . CAC . C . . . G . AC .	320
gc30	A . G . G . C C . G . . . AT . T G . . . CAC . C . . . G . AC .	320
cc10	A . G . G . C A . C . AG A . T G . . . CAC . C . . . G . AC . . . C .	320
ccI	A . G . G . C A . C . AG A . T G . . . CAC . C . . . G . AC . . . C .	320
cc30	A . G . G . C C . G . . . A . C GA . . . CAC . C . . . G . AC .	320
sc-W	ATGAGCTGGAAGAGGCTGAGGAGCGTGCTGACATTTCTGAGTCTCAGGTCAACAAGCTCAGAGTTAAGAGCCGTGATGCT	400
sc-S	 G . . . C . . . C . . . C . C . A . C G . G . CC G . TC	400
gc10	.	400
gcI	 G . . . C . . . C . . . CG . C G . . . G . G . CC G . TC	400
gc30	 G . . . C . . . C . . . CG . C G . . . G . G . C	400
cc10	. . . A . . . G . . T . C . T . . . C . . . CG . C G . . . CC A . .	400
ccI	 G . . T . C . T . . . C . . . CG . C G . . . CC A . .	400
cc30	. C G . . . C G . G . . . A T . . . CC C . C . .	400
sc-W	GGAAAGGCCAAA--GAAGGATGAATCTTTAAAACCTGAAAGGAGCATTTACTGAAGTCATATAATATGAATGTTTAGTG	477
sc-S	. . G . . AGT . . . GAT . . A . . . GACAAG . . . CAC . - - - - - C . AC . AGC . - - . . . G C . TAC . T . .	473
gc10	 A	477
gcI	 AGT . . GAT . . A . . . GACAAG . . . CAC . - - - - - C . AC . AGC . - - . . . G C . TAC . T . . A	473
gc30	 AG . . GGAT . . A . . . GA . GAG . C . TCAC . . CAC . - - - - - C . TC . T . . .	478
cc10	. . G . . A . T . . GTT . . A . . . GACAAG . . . A . - - - - - C . AC . AGC . - - . . . G . - - - - C . AC . T . .	468
ccI	 A . T . . GAT . . TA . . . GACAAG . . . AAC . - - - - - C . AC . AGC . - - . . . G . - - - - C . AC . T . .	468
cc30	. . G . . AG . . GGAT . . A . . . GA . GAGCC . TCCC . CCAC . - - - - - C . AC . AGC . - - . . . C . TAC . T . .	478
sc-W	TAAAG--TACCTTTCTTAATAAACCTGTATATTTCATC----	514
sc-S	. TG . GTTT . T . TG . GTCC . T . . . A . G . C . AGC . --T . G ----	510
gc10	 T	514
gcI	. TG . GTTT . T . TG . GTCC . T . . . ATG . A . A . . --T . G ----	510
gc30	CTGTGT-C . TA . A . GTCC . T C . GT . --C . AAAAGC	517
cc10	CTG . GTTC . T . T . GTCC . T . . . -TG . C . G . G . --T . G ----	504
ccI	CTG . GTTC . T . TG . GTCC . T . . . -TGAC . AT . . AAT . G ----	506
cc30	CTGTGT-C . TATA . ATGC . T . . . -AC . GT . CTCAAGGCA-	518

图1 鲢鱼、草鱼和鲤鱼肌球蛋白重链同工型基因的核苷酸序列比较

Fig. 1 The comparison in the nucleotide sequences of myosin heavy chain isoform genes for silver carp, grass carp and common carp. sc-w、sc-s 分别代表两种鲢鱼肌球蛋白重链同工型基因; gc10、gc1 和 gc30 分别代表三种草鱼肌球蛋白重链同工型基因; cc10、cc1 和 cc30 分别代表鲤鱼三种肌球蛋白重链同工型基因; 阴影表示终止密码子; 箭头表示引物的位置; 下划线表示 polyA 尾巴信号。 sc-w and sc-s are the two types of myosin heavy chain isoform genes from silver carp; gc10, gc1 and gc30 are the three types of myosin heavy chain isoform genes from grass carp; cc10, cc1 and cc30 are the three types of myosin heavy chain isoform genes from common carp; stop codons are shaded; arrows represent locations of primers; polyA signals are underlined.

表 1 鲢鱼、草鱼和鲤鱼肌球蛋白重链同工型基因的核苷酸序列以及推断的氨基酸序列同源性分析
Tab. 1 DNA nucleotide and deduced amino acid sequences identities between myosin heavy chain isoform genes isolated from silver carp, grass carp and common carp

cDNA 克隆 cDNA clone	核苷酸和氨基酸序列的同源性 DNA nucleotide and deduced amino acid sequences identities (%)						
	sc-s	gc10 ^a	gcI ^a	gc30 ^a	cc10 ^b	ccI ^b	cc30 ^b
sc-w	75.3 ^c (87.1) ^d	98.8 (98.5)	76.6 (85.7)	76.7 (87.8)	71.2 (85.0)	71.0 (85.6)	74.3 (87.1)
sc-s		75.5 (87.8)	96.8 (97.1)	90.3 (95.0)	81.0 (92.1)	81.8 (92.1)	80.3 (95.0)
gc10			76.8 (87.1)	76.9 (89.2)	71.6 (86.4)	71.4 (87.0)	74.5 (87.1)
gcI				91.9 (97.8)	82.3 (93.5)	83.1 (93.5)	81.2 (94.2)
gc30					81.1 (92.8)	82.3 (92.8)	82.7 (95.0)
cc10						95.2 (97.1)	82.2 (92.1)
ccI							82.6 (92.1)

注: a. 草鱼三种肌球蛋白重链同工型基因(引自 Tao, *et al.*^[8]); b. 鲤鱼三种肌球蛋白重链同工型基因(引自 Imai, *et al.*^[6]); c. 核苷酸相似性; d. 氨基酸相似性

Note: a. three types of grass carp myosin heavy chain isoform genes (cited from Tao *et al.*^[8]); b. three types of common carp myosin heavy chain isoform genes (cited from Imai *et al.*^[6]); c. nucleotide identity; d. amino acid identity

sc-w	HRLDEAENLAMKGGKKQLQKLESRVRELETEVEAEQRRGADAVKGVRYERRVKELTYQTDEDKKNVARLQDLVDKLQLK	80
sc-s	S.....S.....E.....I.....	80
gc10	S.....S.....E.....T.....	80
gcI	S.....S.....E.....T.....	80
gc30	S.....S.....E.....T.....	80
cc10	S.....H.....A.....E.....T.....N.....	80
ccI	S.....H.....A.....E.....S.....T.....	80
cc30	S.....A.....E.....I.....	80
sc-w	VKVYKRQSEEAEEQANGYLSKLRKVQHELEEAERADISESQVNKLVRKSRDAGKA---KEG--	139
sc-s	..S...A.....TH..RY.....Q.....A...EV..S---DEE-	140
gc10	..A...A.....TH..RY.....Q.....A...EV..S---DEE-	139
gcI	..A...A...S.....TH..RY.....Q.....A...EV..S---DEE-	140
gc30	..A...A...S.....TH..RY.....Q.....A...EV..S---DEE-	140
cc10	..A...A.....TH..RY.....SH.....A.....A...E...T---VEE-	140
ccI	..A...A.....TH..RY.....SH.....A.....A...E...T---DE-	139
cc30	A.....T..TH..RY.....Q.....VA.....A.....S---DEE-	140

图 2 鲢鱼、草鱼和鲤鱼肌球蛋白重链同工型的氨基酸序列比较
Fig. 2 The comparison in the deduced amino acid sequences of myosin heavy chain isoforms for silver carp, grass carp and common carp
阴影部分表示 sc-w 和 gc10 变异的氨基酸残基
Mutations of amino acid residues for sc-w and gc10 are shaded

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鱼适应低温的栖息环境。

2.3 两种肌球蛋白重链同工型基因在不同季节鲢鱼肌肉中的表达

如图 1 所示, 使用前述的 MHY-3F 作为正向引物, 两个反向引物(sc-wR 和 sc-sR)分别来自两种同工型基因的终止密码子下游区域; 这样, 以两对引物之间的 DNA 序列作为探针, 分别以基于春、夏、秋、冬四个季节的鲢鱼第一股 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。另外, 以 β -actin 作为内标, 亦对上述四个模板进行 PCR 扩增。结果如图 3 所示, β -actin 在四种季节的鲢鱼肌肉中都有表达; 鲢鱼低温型(sc-w)在冬季鱼中表达最明显、秋季鱼中次之, 而在春夏季鲢鱼肌肉中几乎无表达; 相比之下, 鲢鱼高温型(sc-s)在夏季鱼肌肉中表达明显, 春季鱼中亦有表达, 但在秋冬季鱼中几乎无表达。据此, 可以认为这两种鲢鱼肌

球蛋白重链同工型基因的表达是伴随鱼栖息环境温度的变化而变化的。

图 3 两种肌球蛋白重链同工型基因在不同季节鲢鱼肌肉中的表达
Fig. 3 The expression of the two myosin heavy chain isoform genes in muscles of silver carp from different seasons
A. sc-w; B. sc-s; C. β -actin; 1、2、3、4 分别代表春、夏、秋、冬四个季节的鲢鱼
A. sc-w; B. sc-s; C. β -actin; 1, 2, 3, 4 represent silver carps from spring, summer, autumn and winter, respectively

我们已经报道了春夏季鲢鱼较秋冬季鲢鱼其肌球蛋白的热稳定性更好^[9,10]。根据本文的研究结果, 可以初步认为, 春、夏季鲢鱼与秋、冬季鲢鱼在肌球蛋白的性质和功能上展现的差异与两种肌球蛋白重链同工型基因在不同季节环境温度下的差异表达有关。虽然春、秋两季具有相似的平均气温, 但是它们在日照时间、鱼对饵料的摄食量、池塘氧气含量等多个方面是不同的, 并且温度的变化趋势也是截然不同的, 这些因素都会影响到基因的表达^[13], 进而导致肌球蛋白重链同工型基因在春秋两季鲢鱼肌肉中的表达是不同的。

虽然哺乳动物已被发现至少存在 13 种肌球蛋白重链同工型基因, 其中 8 种来自于横纹肌, 5 种来自于平滑肌和非肌肉组织^[14], 但属于冷血动物的鱼类究竟含有多少种肌球蛋白重链同工型基因迄今尚未知。目前已经报道的对鲤鱼^[5,6]和草鱼^[8]以及本文对鲢鱼的研究结果证明了广温性的淡水鱼伴随栖息环境温度的变化会差异地表达几种主要的肌球蛋白重链同工型基因。目前, 我们正在以本文的研究结果为基础, 对两种鲢鱼肌球蛋白重链同工型的全长 cDNA 进行测序, 以期进一步深入地研究和阐明两种同工型之间在一些功能区域的初级结构上的差异。

参考文献:

- [1] Harrington W F, Rodgers M E. Myosin [J]. *Ann. Rev. Biochem.*, 1984, **53**: 35—73
- [2] Watabe S, Hirayama Y, Nakaya M, *et al.* Carp expresses fast skeletal myosin isoforms with altered motor functions and structural stabilities to compensate for changes in environmental temperature [J]. *Therm. Biol.*, 1998, **22**: 375—390
- [3] Johnston I A, Frearson N, Goldspink G. The effects of environment temperature on the properties of myofibrillar adenosine triphosphatase from various species of fish [J]. *Biochem. J.*, 1973, **133**: 735—738
- [4] Wang Z, Hu F, Luo Z Y. Seasonal effect on thermostability of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase in freshwater fish muscle [J]. *J. Aquatic Food Product Technol.*, 1997, **6**: 5—15
- [5] Hirayama Y, Watabe S. Structural differences in the cross-bridge head of temperature-associated myosin subfragment-1 isoforms from carp fast skeletal muscle [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1997, **246**: 380—387
- [6] Imai J, Hirayama Y, Kikuchi K, *et al.* cDNA cloning of myosin heavy chain isoforms from carp fast skeletal muscle and their gene expression associated with temperature acclimation [J]. *J. Exp. Biol.*, 1997, **200**: 27—34
- [7] Kikuchi K, Muramatsu M, Hirayama Y, *et al.* Characterization of the carp myosin heavy chain multigene family [J]. *Gene*, 1999, **228**: 189—196
- [8] Tao Y, 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, **139B**: 649—656
- [9] Han L, Tao Y, Wang Z H. 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 [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. 上海水产大学学报, 2007, **16**(4): 362—367]
- [10] Han L, Tao Y, Wang Z H. 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 [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. 水生生物学报, 2008, **32**(2): 22—27]
- [11] Weiss A. The mammalian myosin heavy chain gene family [J]. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1996, **12**: 417—439
- [12] Yuan C, Kaneniwa M, Wang X, *et al.* Seasonal expression of 2 types of myosin with different thermostability in silver carp muscle (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. *J. Food Sci.*, 2005, **70**: C326—C331
- [13] Vornanen M. Seasonal and temperature-induced changes in myosin heavy chain composition of crucian carp hearts [J]. *Am. J. Physiol.*, 1994, **267**: R1567—R1573
- [14] Flück M, Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity—from gene to form and function [J]. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 2003, **146**: 159—216