

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00927

鳊碱性肌球蛋白轻链基因 cDNA 的克隆及其发育表达分析

周瑞雪^{1,2} 黄 斌³ 蒙 涛^{1,2} 褚武英¹ 成 嘉¹ 赵发兰¹
陈敦学¹ 宾石玉² 张建社¹

(1. 长沙大学学院生物工程与环境科学系, 长沙 410003; 2. 广西师范大学生命科学学院, 桂林 541004;
3. 河南信阳师范学院生命科学学院, 信阳 464000)

摘要: 肌球蛋白轻链是构成鱼类肌纤维主要组成部分, 在鱼类肌肉生长和收缩过程中具有重要作用。鳊鱼具有生长快、肉质细嫩、味道鲜美、营养成分高等优良的性状。研究通过构建鳊肌肉组织 cDNA 文库分离到两个碱性肌球蛋白轻链基因, 即 *MLC1* 和 *MLC3* 基因。序列分析显示 *MLC1* 和 *MLC3* 基因 cDNA 序列全长分别为 1237 bp 和 1070 bp, 分别编码 192 和 150 个氨基酸, 除去 *MLC1* N 端多出的 42 个氨基酸残基, *MLC1* 与 *MLC3* 氨基酸序列同源性为 80.3%。通过 PROSITE tools 软件预测显示两种轻链都具有两个保守的 EF-手相结构, 其中第二个 EF-hand 结构除前三个氨基酸外同源性达 100%。鱼类 *MLC3* 轻链 N 端没有高等脊椎动物 *MLC3* 特有标志序列。采用实时荧光定量 PCR 方法对鳊鱼 *MLC1* 和 *MLC3* 发育性表达分析表明, 在原肠期开始有低量表达, 与原肠期、尾芽期和肌肉效应期相比, 心搏期和仔鱼期 *MLC1* 和 *MLC3* 表达量显著升高。研究结果首次提供了鳊肌肉组织肌球蛋白主要结构基因的分子生物学信息以及它们在鳊肌肉组织发生和功能的相关性。

关键词: 鳊; 碱性肌球蛋白轻链; 克隆; cDNA 文库; 发育表达

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)05-0927-08

肌球蛋白是肌肉主要结构蛋白之一。脊椎动物肌球蛋白的分子结构为“Y”形不对称六聚体, 长约 160 nm, 由两条分子量约 220 kD 左右肌球蛋白重链(MYH)和 4 条分子量为 16—20 kD 左右短链即肌球蛋白轻链(MLC)组成^[1,2]。肌球蛋白轻链与肌钙蛋白 C、钙调蛋白同属于 EF 手相超家族成员, EF 手相是一种由 40 个左右氨基酸组成的螺旋区—泡区—螺旋区模体(Motif), 泡区通常是该类蛋白的 Ca^{2+} 结合区域^[3]。

肌球蛋白轻链主要存在 3 种类型, 分别命名为 *MLC1*、*MLC2*、*MLC3*。 *MLC1* 和 *MLC3* 在碱性条件下容易从肌球蛋白分子上解离下来, 故称碱性轻链, 而 *MLC2* 易受巯基试剂作用而解离, 故称巯解轻链^[4]。肌球蛋白重链和轻链的 N 端结合折叠形成头部和颈部调节结构域, 称为 subfragment1 (S1), S1

包含 ATP 酶催化和肌动蛋白结合位点^[5]。鸡 S1 三维结构表明肌球蛋白轻链有助于稳定肌球蛋白颈部区域^[6]。碱性轻链还参与肌球蛋白与肌动蛋白相互作用, 而且 *MLC1* 和 *MLC3* 表达量的比值与肌肉收缩速率存在线性关系^[7]。

哺乳动物刚出生时其肌纤维数量就已经确定, 随后依靠肌纤维的增长和增粗来适应身体的生长。但是鱼类刚孵化成幼鱼时其形成的肌纤维数量只有几千条, 随着鱼体不断生长, 原来处于静止期的鱼肌肉卫星细胞(属于多潜能干细胞)被激活进入有丝分裂期、增殖期, 并进一步分化融合形成肌管。由于鱼肌肉卫星细胞(SC)分裂分化, 成鱼肌纤维数量可以达到上百万条, 因此鱼肌肉卫星细胞大量分裂分化是鱼肌纤维数量增加主要原因^[8]。肌球蛋白轻链是构成鱼类肌纤维重要组成部分, 阐明其在鱼类

收稿日期: 2009-08-07; 修订日期: 2010-05-02

基金项目: 湖南省教育厅重点项目(09A008); 湖南省高校科技创新团队项目资助

作者简介: 周瑞雪(1984—), 女, 内蒙古赤峰人; 硕士; 主要从事鱼类分子生物学研究。E-mail: numingxue@163.com

通讯作者: 张建社, Tel: 0731-4261245; E-mail: jzhang@ccsu.cn

肌肉生长和收缩过程中的作用具有重要意义,因此许多学者开展了发育、环境及营养因子对其表达影响和调控机制研究^[9,10]。

鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)是经济价值很高的名贵鱼类,享有“淡水石斑”之誉。它隶属鲈形目(Perciformes)、鳊亚科(Sinipercinae),具有生长快、肉质细嫩、味道鲜美、营养成分高等优良性状。有鉴于此,本研究选择鳊鱼肌球蛋白碱性轻链基因进行克隆和发育性表达分析,为今后进一步研究该类基因在鳊鱼肌肉生长和发育中的作用,以及研究不同养殖环境对该类基因表达的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲜活鳊鱼购于长沙西长街特种水产品市场,解剖获取鱼背部新鲜肌肉组织用于基因文库的构建;在湖南省水产研究所鳊鱼原种场取原肠期、尾芽期、肌效期、心博期和仔鱼 5 个不同发育阶段的鳊鱼样品用于基因表达的研究,材料均用液氮迅速冷冻后保存于-80℃超低温冰箱中备用。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 文库构建

总 RNA 采用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取。所提取的总 RNA 测定其 OD 值,同时采用琼脂糖电泳测定其浓度和纯度。mRNA 分离采用 Oligotex mRNA 提取试剂盒(QIAGEN),按试剂盒说明书从总 RNA 中分离纯化富含 poly(A)的 mRNA。以纯化的 mRNA 为模板,采用 SuperscriptII-RT 逆转录酶和 poly(T)引物合成单链 cDNA,继而采用常规 PCR 方法以第一条单链 DNA 为模板合成双链 cDNA(dsDNA)。合成的双链 DNA 经 T4 DNA 聚合酶末端补平后,采用 Stratagene *EcoR* I-*EcoR* I adaptor 添加酶切末端。继而,双链 DNA 末端在 T4 PNK 磷酸激酶作用下进行 cDNA 末端的磷酸化。经 *Xho*I 酶切后的双链 DNA 采用 QIAEXII 胶回收试剂盒进行回收,并采用 T4 DNA 连接酶将 cDNA 连接到 PBK(E/X)质粒载体。重组后的质粒载体经纯化后采用电转化方法转化到感受态细胞(BH5-2)中。取 20 μ L 转化产物加 160 μ L SOC 培养基(2% Trytone, w/w; 0.5% yeast extract, w/w; 0.05% NaCl, w/w; 2.5 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 20 mmol/L glucose)涂板,放于 37℃(温度)过夜培养,次日查看转化效果。其涂板含有 Amp^r,并均匀涂入 X-Gal 80 μ L 和 IPTG 20 μ L。

1.3 文库的菌落 PCR 鉴定以及 cDNA 克隆和大规模 EST 测序

随机挑选 32 个单克隆白斑作为模板,分别加入 T3 引物、T7 引物和 Polymerase Mix 进行 PCR 扩增,共 35 个循环。用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测。带有 cDNA 克隆的菌落涂板培养(37℃)后,大量随机挑选单克隆白斑,经扩大培养,提取质粒进行 DNA 序列测定。测序工作在中国科学院基因组研究所进行。利用载体 T7 为测序引物,用 ABI 3730 DNA 自动测序仪进行。

1.4 肌球蛋白轻链基因 cDNA 的筛选

用 BLASTX 程序将 cDNA 序列与已知的肌球蛋白轻链基因进行序列比对,筛选鳊鱼肌球蛋白轻链 1 和轻链 3 基因序列。

1.5 氨基酸序列比对和蛋白质功能区分析

采用 NCBI 中的 BLAST 程序进行目的基因序列同源性比对和相似性搜索,序列分析使用 DNASTar 分析软件,Edit Seq 用于 ORF 分析以及蛋白序列的推测。蛋白质功能区由 PROSITE tools(<http://www.expasy.org/prosite>)预测。

1.6 基因表达分析

鳊肌肉 RNA 的提取和 cDNA 单链的合成

根据 Trizol Reagent(Invitrogen)试剂盒使用说明从鳊鱼不同发育时期的样品中分别提取总 RNA。cDNA 单链的合成按 Fermentas 公司 cDNA 合成试剂盒产品说明书进行。反转录引物即 oligo-dT 接头引物序列为:GGCCACGCGACTAGTAC(T)₁₆。

引物设计及荧光定量 PCR 根据已获得的鳊鱼碱性轻链基因保守序列,用 Primer 5.0 软件设计 *MLC1* 和 *MLC3* 基因的荧光定量 PCR 引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成引物(具体序列及产物见表 1)。两对引物同时以鳊鱼的不同发育阶段的 cDNA 为模板进行扩增,研究碱性 *MLC* 基因在不同发育阶段的 mRNA 的相对表达量。

采用 SYBR Green 染料法,在荧光定量仪(Light Cycler, Rotor-Gene 公司)上进行扩增和数据分析。以最小 *Ct* 值和最高荧光值为标准,分别对循环条件、退火温度、引物浓度进行优化。最后确定反应体系为 25 μ L: 13 μ L Takara SYBR Premix Ex Taq (2 \times , 预混 MgCl₂、dNTP、SYBR Green 染料、EX-Taq 聚合酶、Buffer), 1 μ L 引物(10 μ mol/L), 1 μ L cDNA 模板, ddH₂O 补充至总体积。二步法反应程序

表 1 用于荧光定量分析的目的基因和内参基因的引物参数
Tab.1 Primers used for real-time quantitative PCR analyze

基因 Gene	引物序列 Prime Sequence	产物大小 Product size (bp)
<i>MLC1</i>	S: 5'-AACCCCTCCAATGACGACA-3' A: 5'-AATCTCAGGCTCAGTCATCTTCTC-3'	216
<i>MLC3</i>	S: 5'-CTGAAGCAGGTTGACGCCAT-3' A: 5'-ACACTGCCGTTCTCGTCCTCC-3'	194
<i>β-actin</i>	S: 5'-ATCGTGCGCCCCAGGCACC-3' S: 5'-CTCCTTAATGTACGCACGATTTC-3'	144

如下: 95℃10s 预变性; 95℃5s 变性, 58℃20s 退火、延伸, PCR 循环 40; 绘制溶解曲线: 65—95℃, 每 0.2℃读板 1 次; 72℃ 10min; 结束后将反应产物置于 4℃保存。每组重复 5 个样。

PCR 产物扩增、序列测定及分析 将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳确定, 并切取含有目的片段的凝胶, 割胶回收纯化 PCR 产物, 纯化 PCR 产物连接到 pGEM-T Easy 载体上。取连接产物转化到 *E. coli* DH5α 感受态细胞中, 涂在含氨苄青霉素的 LA 平板上, 挑取白色单菌斑培养, 确定阳性克隆。将筛选出的阳性克隆抽提质粒, 进行序列测定, 再把测定的结果与 GenBank 登录的碱性肌球蛋白轻链基因序列进行比较。

1.7 数据处理

实时荧光定量 PCR 结束后, 实验数据用 Excel 2003 软件进行初步处理, 运用公式 $=2^{-\Delta\Delta C_t}$, 公式中 $\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 管家基因}})_{\text{实验组}} - (C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 管家基因}})_{\text{对照组}}$ 计算目的基因的表达量。采用 SPSS 12.0 软件对所得表达丰度数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 采用最小显著差数法(LSD)进行多重比较。P<0.05 具有显著性差异。所有结果以平均值±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示。

2 结 果

2.1 鳕鱼 *MLC1* 和 *MLC3* 序列分析

所得的序列经 Blast 软件分析, 得到鳕鱼 *MLC1* 和 *MLC3* 基因(GenBank 登录号分别为 FJ428248 和 FJ374271)。*MLC1* 基因 cDNA 序列全长 1237 bp, 编码区长度为 579 bp, 5'端非编码区 113 bp, 3'端非编码区长 551 bp, 3'末端出现加尾信号 AATAAA 和多聚腺苷酸 Poly(A) (图 1)。鳕鱼 *MLC1* 分子量为 20751.54 kD, 等电点为 4.511, 包含 69 个疏水性氨基酸, 天冬氨酸、谷氨酸总数为 31 个, 精氨酸赖氨酸总数为 20 个, 脯氨酸含量也较高含 16 个, 编码的氨基酸含有 2 个 EF-手相结构(图 2)。

MLC3 基因 cDNA 序列全长 1070 bp, 编码区长 453 bp, 3'端非编码区长 503 bp, 3'末端出现加尾信号 AATAAA 和多聚腺苷酸 Poly(A) (图 1)。鳕鱼 *MLC3* 分子量为 16651.86 kD, 等电点为 4.27, 包含 53 个疏水性氨基酸, 天冬氨酸、谷氨酸总数为 27 个, 精氨酸、赖氨酸总数为 14 个, *MLC3* 也含有两个 EF-hand 结构(图 2)。

鳕鱼 *MLC1* 和 *MLC3* 核苷酸序列同源性为 43.8%。除去 *MLC1* 轻链 N 端多出的 42 个氨基酸残基, *MLC1* 与 *MLC3* 氨基酸序列同源性为 80.3%。两种轻链的 EF-hand 结构区域有着相对较高的保守性, 其中第 2 个 EF-hand 结构除前三个氨基酸外同源性达 100% (图 2)。

2.2 序列比对和分析

序列同源性比对表明各种动物 *MLC1* 的氨基酸残基数量不尽相同, 如鳕鱼 *MLC1* 比金枪鱼、人及鲤鱼的 *MLC1* 分别少 6 个、2 个、1 个氨基酸, 但比家鼠多了 6 个氨基酸。鳕鱼与白姑鱼 *MLC1* 同源性最高, 达到 92.2%, 鳕鱼与金枪鱼、燕鲷 *MLC1* 同源性也在 90%以上, 但是鳕鱼与家鼠、人 *MLC1* 同源性较低, 分别为 65.4%和 65.1%(图 3)。

序列同源性比对表明鳕鱼与人、家鼠 *MLC3* 氨基酸残基数量相同, 为 150 个, 但是同源性最低, 均存在着 53 个氨基酸的差异。金枪鱼比鳕鱼 *MLC3* 轻链 N-端多了 20 个氨基酸残基, 但是重叠部分序列同源性很高, 只有 13 个氨基酸存在差异。与斑马鱼和鲤鱼 *MLC3* 氨基酸系列相比, 鳕 *MLC3* 少了 3 号位的谷氨酸, 但在 23、24 号分别多出了 1 个甘氨酸和谷氨酸。在哺乳动物 *MLC3* 轻链 N-端存在由 9 个氨基酸残基组成的特殊区域, 而鱼类 *MLC3* 轻链 N-端此特殊区域氨基酸序列变化较大, 如金枪鱼 *MLC3* 此区域可以达到 22 个残基(图 4)。

2.3 鳕鱼 *MLC1* 和 *MLC3* 在发育阶段的 mRNA 相对表达

如图 5 显示, 鳕鱼 *MLC1* 基因在胚胎发育的不

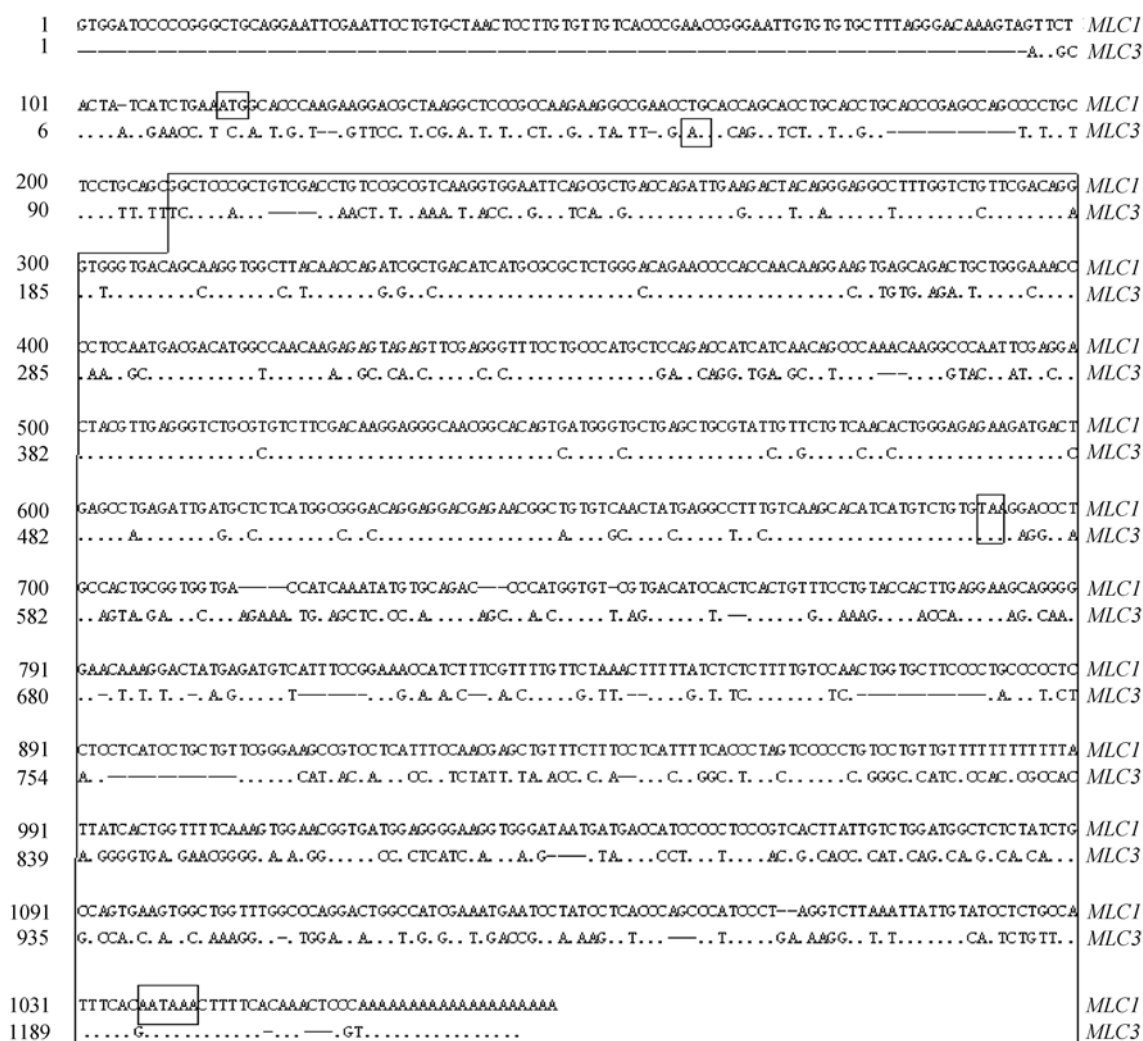
图 1 鳙鱼 *MLC1* 和 *MLC3* 核苷酸序列的比较

Fig. 1 Nucleotide sequences of cDNA clones encoding carp myosin alkali light chains

序列“_”表示起始密码子; “_”终止密码子; 阴影部分表示加尾信号; 标“ ”部分表示鱼类和哺乳类、鸟类 *MLC1* 和 *MLC3* 共有的核苷酸序列

“_” indicate start codon; “_” indicate end codon; the shadow part indicate signal of Plus the end; The large box indicates where *MLC1* and *MLC3* from avian and mammalian species share an identical nucleotide sequence

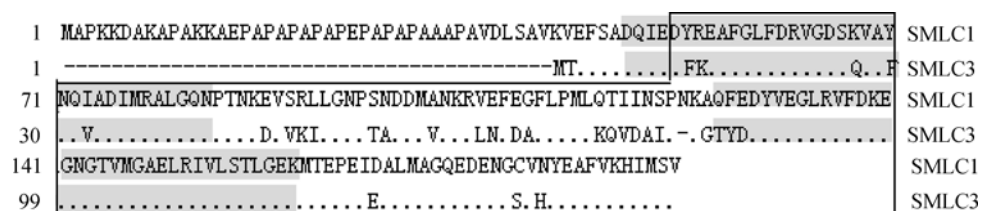
图 2 *MLC1* 和 *MLC3* 编码氨基酸同源性的比较

Fig. 2 Comparison of deduced amino acid sequences of carp myosin alkali light chains

灰色部分表示 EF-hand; 标“ ”部分表示鱼类和哺乳类、鸟类 *MLC1* 和 *MLC3* 共有的氨基酸序列

Shadow indicates EF-hand; A box indicates the area where *MLC1* and *MLC3* share an identical amino acid sequence in avian and mammalian species

同阶段呈依次递增趋势。仔鱼时期表达量最高, 与原肠、肌肉效应期和尾芽期相比差异极显著($P < 0.01$), 心搏时期 *MLC1* 基因表达量次之, 也显著高于原肠、

肌肉效应期和尾芽期($P < 0.01$), 但心搏时期与仔鱼时期相比差异不显著($P > 0.05$)。原肠时期、肌效时期与尾芽时期之间差异亦不显著($P > 0.05$)。

1	MAPKKDAK--APAKKAEPAP----APAPAPPEPAP--APAAAP--AVDL SAVKVEFSADQIEDYREAFGLF	<i>Siniperca chuatsi</i>
1--.....KKAEP.....A.E.AP...PA--.....K.....	<i>Thunnus thynnus</i>
1P.--.....--.....A.E.A--.....I..G.....	<i>Pennahia argentata</i>
1-A...R.PSLQS--A.....D--VV..P.--L...K...TP..H..K.....	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
1P.--.....--.....K.--.....I.I.....VD.....	<i>Cypselurus agoo</i>
1KPE.....--.....A.E--..PKPA--.....G...D.NQ..L.....	<i>Cyprinus carpio</i>
1K--.....K--.....E.AP...PA--.....I..TP..V..K.....	<i>Decapterus maruadsi</i>
1V.--K.VAA.AA.--.....A.....KPKKEKI...I.I..KE.QDEFK...L...	<i>Homo sapiens</i>
1V.--K.--A-----.....A.....KPKKEKI...I.I..KE.Q..FK...L...	<i>Mus musculus</i>
61	DRVGD SKVAYNQIADIMRALGQNPTNKEVSRLLGNP SNDDMANKRVEFEGFLPMLQTIINSPNKAQFEDY	<i>Siniperca chuatsi</i>
67N.....D.AK...M..AE..T.....GY...	<i>Thunnus thynnus</i>
62N.....K.....TA..S.....G...	<i>Pennahia argentata</i>
62V.....R.KV...DE...A..L..A.....H.V.D...GT.D..	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
60N.....NK.....TPE.....A.....G.....	<i>Cypselurus agoo</i>
62N.....TKI...TA.E.....D.....FVV.....TY...	<i>Cyprinus carpio</i>
63N.....AK...S..AE.....GY...	<i>Decapterus maruadsi</i>
63	..T...ITLS.VG.VL...T...A..R.KV...EELNA.KI...Q...M.A.S.NKDQ.TY..F	<i>Homo sapiens</i>
57	..T.EC.ITLS.VG.VL...T...A..K.KV...EE.NA.KI...Q...M.A.S.NKDQGGY..F	<i>Mus musculus</i>
131	VEGLRVFDKEGNGTVMGAELRIVLSTLGEKMTPEIDALMAGQEDENGCVNYEAFVKHIMSV	<i>Siniperca chuatsi</i>
137A.....Q.....S.....	<i>Thunnus thynnus</i>
132A.....	<i>Pennahia argentata</i>
132G.....S.A..G..Q.....SI.F.....I	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
130A.....	<i>Cypselurus agoo</i>
132V.....Q.....	<i>Cyprinus carpio</i>
133A.....T.....S.G.....	<i>Decapterus maruadsi</i>
133H..A.....K.E.VE.....S...I.....I	<i>Homo sapiens</i>
127H..A.....K.E.VE..L.....S...I.....	<i>Mus musculus</i>

图3 MLC1 与其他物种的相应氨基酸同源性氨基酸比较

Fig. 3 Compared MLC1 with the corresponding amino acid sequence of other species

1	-----MTEFSADQIEDFKEAFGLFDVRVGSQVAFNQVADIMRALGQNPTNKDVV	<i>Siniperca chuatsi</i>
1	MAEAEAAAAPAPAPPEPAPAAAAGGA.....N.....H	<i>Thunnus thynnus</i>
1	---MADAAPAEA-----SGSA.....K.....MIGY.....V.X.....Q..E.A	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
1	-----MAG..T.....K..Y.....K	<i>Danio rerio</i>
1	-----TP.....I.....	<i>Cypselurus agoo</i>
1	-----MAG.....NK..Y.....K	<i>Cyprinus carpio</i>
1	-MAEAAAAPAPA-----AA..T.....G..G.....C...T	<i>Decapterus maruadsi</i>
1	-----MS.....A.....L...T.ECKITLS..G.VL...T...AE.K	<i>Mus musculus</i>
1	-----MS.....AE.....L...T...KITLS..G.VL...T...AE.R	<i>Homo sapiens</i>
MLC3-specific domain		
50	KILGNPTADDMMVNKRLNFDALPMLKQVDAIP-KGTYYDYVEGLRVFDKEGNGTVMGAELRIVLSTLGEK	<i>Siniperca chuatsi</i>
71A.....T.....TFQ--.....	<i>Thunnus thynnus</i>
60	A...K.SP...A...A.AD.M..MEK..K.V--L.....S..DV...G.....	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
51	...D.S...A...ID.E.....T..NQ--.....	<i>Danio rerio</i>
50	...S.E..A...I.....E..MT--.....	<i>Cypselurus agoo</i>
51	...D.S...A...ID.....T..VQ--.....	<i>Cyprinus carpio</i>
62	...S...A...A...M.....LQ--.....	<i>Decapterus maruadsi</i>
49	.V...SNEE.NA.KIE.EQ...MQAISNNKDQ.G.E.F.....H..A.....	<i>Mus musculus</i>
49	.V...SNEELNA.KIE.EQ...MQAISNNKQA..E.F.....H..A.....	<i>Homo sapiens</i>
Ancestral Ca ²⁺ -binding domain		

图4 MLC3 结构分析以及与其他物种的相应氨基酸同源性氨基酸比较

Fig. 4 Structural analysis of MLC3 and compared with the corresponding amino acid sequence of other species

如图 6 所示, 鳊鱼 *MLC3* 基因在胚胎发育的不同时期 mRNA 相对表达量同样为依次递增趋势。其中原肠阶段 *MLC3* 相对表达量最低, 原肠、尾芽、肌效三个阶段与心搏期差异均呈显著 ($P < 0.05$), 与

仔鱼阶段相比差异均为极显著 ($P < 0.01$)。原肠、尾芽期与肌肉效应期之间相对表达量差异不显著 ($P > 0.05$), 心搏和仔鱼阶段之间的相对表达量差异亦均不显著 ($P > 0.05$)。

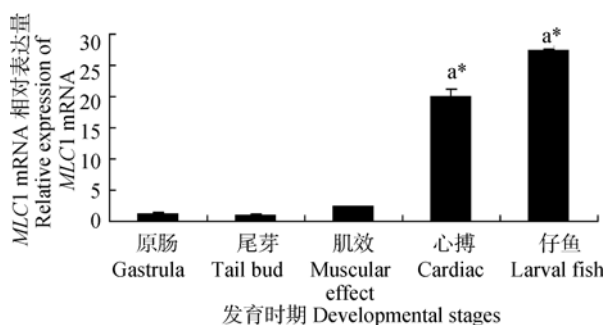


图5 鳊鱼 MLC1 mRNA 相对表达量的发育性变化

Fig. 5 Siniperca MLC1 mRNA relative expression quantity of changes in developmental

不同发育阶段肌球蛋白碱性轻链相对于 β -actin mRNA 表达丰度的统计结果, 数据用平均数 $\bar{X} \pm SD$ 表示; 无相同字母者表示肌球蛋白碱性轻链基因在不同发育阶段之间差异显著 ($P < 0.05$); ‘*’ 表示不同发育阶段间差异极显著 ($P < 0.01$); $n=5$; 下同

Different developmental stages alkaline myosin light chain relative to the expression of β -actin mRNA abundance results, Data indicated $\bar{X} \pm SD$; without the same letter that the alkaline myosin light chain gene in different developmental stages is a significant difference ($P < 0.05$), difference have a particular significant between developmental stages ($P < 0.01$); $n=5$; the same bellow

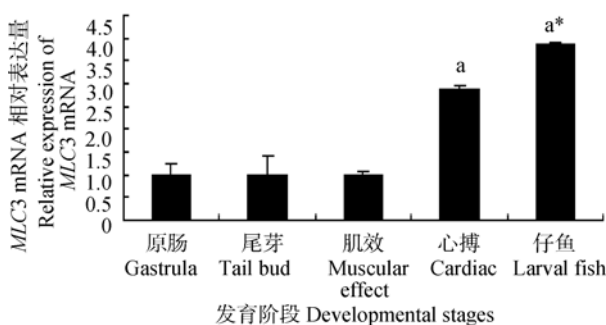


图6 鳊鱼 MLC3 mRNA 相对表达量的发育性变化

Fig. 6 Siniperca MLC3 mRNA relative expression quantity of changes in developmental

3 讨论

3.1 鱼类 MLC1 和 MLC3 的起源与进化

哺乳动物和鸟类快肌 MLC1 和 MLC3 分别由 190 和 150 个氨基酸残基左右组成, 我们通过 cDNA 序列推导的鳊鱼 MLC1 和 MLC3 分别由 192 和 150 个氨基酸残基组成, 虽然鳊鱼碱性肌球蛋白轻链在组成氨基酸数量上与高等脊椎动物差别不大, 但是鳊鱼与家鼠、人碱性肌球蛋白轻链同源性较低, MLC1 只有 65%, MLC3 更低, 只有 36%。哺乳动物和鸟类快肌 MLC1 和 MLC3 轻链 C 末端 141 个氨基酸同源性 100%, 但是它们在 N 末端序列长度和同源性上都存在很大差异^[11], 而且对鸡、小鼠和大鼠 MLC1 和 MLC3 基因 DNA 序列比较分析表明: 它们

的 MLC1 和 MLC3 是由同一个基因编码产生, 通过转录过程中剪接位点不同产生两种不同蛋白^[12,14]。Dalla, *et al.*发现鳊鱼 MLC1 和 MLC3, 轻链无论是 N 末端还是 C 末端都存在差异氨基酸残基^[15], Yasushi 也发现鲤鱼 MLC1 和 MLC3 轻链存在同样情况, 进一步 Southern 杂交实验证明鲤鱼 MLC1 和 MLC3 由不同基因编码, 因此许多学者认为鱼类 MLC1 和 MLC3 进化机制与高等脊椎动物不同^[16]。我们研究结果表明: 鳊鱼 MLC1 和 MLC3 轻链 C 末端 141 个氨基酸序列同源性为 80.3%, 与鳊鱼和鲤鱼研究结果一致, 因此鱼类 MLC1 和 MLC3 可能由共同祖先基因经过不同的进化过程而形成的两种不同蛋白。

3.2 鱼类 MLC1 和 MLC3 结构功能

高等脊椎动物 MLC1、MLC2、MLC3 和肌钙蛋白 C 由同一个祖先进化而来, 均含有 4 个相似的能与 Ca^{2+} 结合的结构域^[17]。Holland, *et al.*认为 4 个 Ca^{2+} 结构域是由原始单一的钙离子结合域历经 4 次串联复制进化而形成。每个结构域包括螺旋区-泡区-螺旋区(即 EF 手相结构), 泡区为与 Ca^{2+} 结合中心位点^[18]。由于在进化过程中氨基酸序列损失、替换, 导致蛋白中某些 EF 手相结构失去了与 Ca^{2+} 结合的能力, 如肌钙蛋白 C 只有 2 个 EF 手相结构存在 Ca^{2+} 结合的能力。通过 PROSITE tools 软件预测显示鳊鱼 MLC1 和 MLC3 均只具有 2 个 EF 手相结构, 其中第二个 EF-hand 结构除前三个氨基酸外同源性达 100%。通过与其他物种的相应序列比较发现鳊鱼的碱性轻链第 2 个 EF-hand 结构也存在古老的 Ca^{2+} 结合位点的, 其出现位置与高等脊椎动物类似, 而且相应氨基酸残基相当保守。这些物种碱性轻链虽然存在古老的 Ca^{2+} 结合位点, 但是其是否具有结合金属离子的能力还是存在争议。

3.3 鱼类 MLC1 和 MLC3 的肌肉收缩和发育调控作用

目前高等脊椎动物 MLC1 和 MLC3 在肌肉收缩中和发育过程中的调控作用还没有完全明确, Lowrey, *et al.*实验结果表明相对低等的鱼类碱性轻链表达量与不同肌纤维收缩存在相关性^[7], Kanoh 认为通过深入研究鱼类碱性轻链在不同肌纤维中的特异性表达分析, 有助于阐明其在肌肉收缩中调控作用^[19]。我们在鱼类 MLC3 轻链 N 端找不到高等脊椎动物 MLC3 特有标志序列, 证明高等脊椎动物和鱼类碱性轻链存在进化上的差异, 鱼类碱性轻链可能

保持了一些高等脊椎动物碱性轻链没有的原始功能, 对这些功能分析会更加深入了解碱性轻链在肌肉收缩中所起的作用。

另外碱性肌球蛋白轻链在脊椎动物肌肉发育过程中的表达调控机理也没有明确。小鼠在体节形成前没有检测到 *MLC1* 和 *MLC3* 表达, 但在随后发育过程中两个基因表达图谱不同步^[20,21]。而非洲爪蟾在中胚层形成体节过程中 *MLC1* 和 *MLC3* 表达已经检测到, 在随后发育过程中两个基因表达图谱是同步进行的^[22,23]。Pierre, *et al.* 用原位杂交的方法发现虹鳊鱼 *MLC1* 在体节出现时开始有表达, 而 *MLC3* 要比 *MLC1* 稍微晚些, 尾芽出现之前才开始表达^[24]。显然哺乳类、鱼类和两栖类 *MLC1* 和 *MLC3* 发育性表达存在差异。我们采用 Real-time PCR 的方法对鳊鱼碱性肌球蛋白轻链胚胎的不同发育时期的 mRNA 相对表达量比较分析表明, 在囊胚阶段鳊鱼碱性肌球蛋白轻链基因没有检测到表达, 其在原肠阶段才开始有表达, 与原肠期相比, 尾芽期和肌肉效应期表达量升高趋势不明显, 心搏和仔鱼阶段碱性肌球蛋白轻链表达量均显著升高。这与我们采用基因芯片技术所获得的鳊鱼肌球蛋白轻链基因表达结果基本一致^[25]。我们之前已经用 Real-time PCR 的方法检测到鳊鱼肌球蛋白重链基因在肌肉效应期才开始有低量的表达^[26], 而鳊鱼碱性肌球蛋白轻链在尾芽期之前就已经开始有表达, 因此我们推测碱性肌球蛋白轻链可能在肌肉形成和分化过程中起到重要的作用, 碱性肌球蛋白轻链在鳊鱼肌肉发育过程中的功能和调节机理有待进一步证明。

参考文献:

- [1] Knight A E, Moolloy J E. Muscle, myosin and single molecules [J]. *Essays Biochem*, 2000, **35**: 43—59
- [2] Lutz G J, Lieber R L. Skeletal myosin structure and function [J]. *Exerc Sport Sci Rev*, 1999, **27**: 63—77
- [3] Kretusunger R H, Nockolds C E. Carp muscle calcium-binding protein [J]. *Biol Chem*, 1973, **248**(9): 3313—3326
- [4] Pette D, Starot R S. Myosin isoforms, muscle fiber types and transitions [J]. *Microsc Res Tech*, 2000, **50**: 500—509
- [5] Fu G H, Zhang J S. Progress and prospect on myosin heavy chain genes in fish [J]. *Letters in Biotechno*, 2008, **19**(2): 306—309 [符贵红, 张建社. 鱼类肌球蛋白重链基因研究进展及讨论. 生物技术通讯, 2008, **19**(2): 306—309]
- [6] Fitzsimons D P, Bodell P W, Herdick R E, *et al.* Left ventricular functional capacity in the endurance trained rodent [J]. *Appl Physiol*, 1990, **69**(1): 305—312
- [7] Lowey S and Trybus K M. Role of skeletal and smooth muscle myosin light chains [J]. *Biophys*, 1995, **68**: 120—127
- [8] Youn B W, Malacinski G M. Comparative analysis of amphibian semite morphogenesis: Cell rearrangement patterns during resette formation and myoblast fusion [J]. *J Embryol Exp Morpho*, 1981, **66**: 1—26
- [9] Shi Y H, Liu J, Gui J F. Cloning and characterization of three myosin light chain cDNA from silver crucian carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(3): 308—313 [石耀华, 刘军, 桂建芳. 银鲫 3 个肌球蛋白轻链基因 cDNA 的克隆与特征分析. 水生生物学报, 2003, **27**(3): 308—313]
- [10] Han L, Tao Y, Wang Z H. Seasonal changes in thermodynamic activation parameters of myosin Ca²⁺-ATPase from grass carp and silver carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(2): 162—166 [韩黎, 陶妍, 汪之和. 草鱼和鲢鱼肌球蛋白 Ca²⁺-ATPase 热力学活化参数的季节变化. 水生生物学报, 2008, **32**(2): 162—166]
- [11] Nabeshima Y, Fujii-Kuriyama Y, Muramatsu M, *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequences of the complementary DNAs to chicken skeletal muscle myosin two alkali light chain mRNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1982, **10**: 6099—6110
- [12] Nabshima Y, Fujii-Kuriyama Y, Muramatsu M, *et al.* Alternative transcription and two modes of splicing result in two myosin light chains from one gene [J]. *Nature*, 1984, **308**: 333—338
- [13] Robter B, Daubas P, Akimenko M A, *et al.* A single locus in the mouse encodes both myosin light chains 1 and 3, a second locus corresponds to a related pseudogene [J]. *Cell*, 1984, **39**: 129—140
- [14] Periasamy M, Strehler E E, Garfinkel L I, *et al.* Fast skeletal muscle myosin light chains 1 and 3 are produced from a single gene by a combined process of differential RNA transcription and splicing [J]. *J. Biol. Chem*, 1984, **259**: 13595—13604
- [15] Dalla Libera L, Carpena E, Theibert J, *et al.* Fish myosin alkali light chains originate from two different genes [J]. *J. Muscle Res. Cell Moti*, 1991, **12**: 366—371
- [16] Yasushi Hirayama I, Satoshi Kanoh, Misako Nakaya, *et al.* The two essential light chains of carp fast skeletal myosin, LC1 and LC3, are encoded by distinct genes and change their molar ratio following temperature acclimation [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1997, **200**: 693—701
- [17] Qin H, Morris B J, Hoh J F. Isolation and structure of catmyosin light chain 2 cDNA and evidence for the identity of its human homologue [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **200**: 1277—1282
- [18] Holland L Z, Pace D A, Blink M L, *et al.* Sequence and expression of amphioxus alkali myosin light chain(amphiMLC-alk) throughout development: implications for vertebrate

- emyogenesis [J]. *Dev. Biol.* 1995, **171**: 665—676
- [19] Kanoh S, Watabe S and Hashimoto K. Isolation and some physicochemical properties of requiem shark myosin [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1983, **49**: 757—763
- [20] Sassoon D, Garner I, Buckingham M. Development and hormone regulation of androgen receptor levels in the sexually dimorphic larynx of *Xenopus laevis* [J]. *Development*, 1988, **104**: 155—164
- [21] Lyons G E, Ontell M, Cox R, *et al.* The expression of myosin genes in developing skeletal muscle in the mouse embryo [J]. *Cell Biol*, 1990, **111**: 1465—1476
- [22] Hardy S, Thézé N, Lepetit D, *et al.* The *Xenopus laevis* TM-4 gene encodes non-muscle and cardiac tropomyosin isoforms through alternative splicing [J]. *Gene*, 1995, **156**(2): 265—270
- [23] Dalla L, Libera E, Carpena J, *et al.* Clinical experience of emergency coronary artery bypass grafting following failed percutaneous transluminal coronary angioplasty [J]. *Cell Motil*, 1991, **12**: 366—371
- [24] Pierre T B, Pierre-Yves Rescan, Wilfrid Barillot, *et al.* Developmental program expression of myosin alkali light chain and skeletal actin genes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, **1519**: 139—142
- [25] Zhang J S, Xia X J, Chu W Y, *et al.* Gene expression profiles of the muscle tissues of the Mandarin fish, *Siniperca chuatsi* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(1): 46—53 [张建设, 夏新界, 褚武英, 等. 基于异源 cDNA 基因芯片杂交的鲈鱼肌肉组织基因表达谱初步分析. 水生生物学报, 2009, **33**(1): 46—53]
- [26] Zhang J S, Fu G H, Chu W Y, *et al.* cDNA cloning and expression analysis of the myosin heavy chain (MYH) gene of the mandarin fish *Siniperca kneri* [J]. *Aquaculture Research*, 2009, **40**(4): 42—418

CLONING AND ONTOGENETIC EXPRESSION ANALYSIS OF THE ALKALI MYOSIN LIGHT CHAIN GENE IN *SINIPERCA CHUASTI*

ZHOU Rui-Xue^{1,2}, HUANG Bin³, MENG Tao^{1,2}, CHU Wu-Ying¹, CHENG Jia¹, ZHAO Fa-Lan¹, CHEN Dun-Xue¹, BIN Shi-Yu² and ZHANG Jian-She¹

(1. Department of Bioengineering and Environmental Sciences, Changsha University, Changsha 410003, China; 2. College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China; 3. College of Life Sciences, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China)

Abstract: Myosin light chains are major components of fish muscle fibers, and they play an important role in the process of muscle growth and contraction. The mandarin fish has been recently becoming one of the most important aquaculture fish species in China because of its good meat quality and protein composition. To a better understanding of the muscle development and its genetic controls, we constructed a cDNA library of the fast skeletal muscles the mandarin fish, *S. chuatsi* and successfully isolated two myosin light chains genes, *MLC1* and *MLC3*. The length of the *MLC1* and *MLC3* cDNA was 1237 bp and 1070 bp, predicated encoding protein of 192 and 150 amino acids, respectively. Excepting the 42 amino acid residues of the N terminal of the *MLC1*, the homology of the deduced amino acids sequences of the *MLC1* and *MLC3* was 80.3%. The two alkaline chains included two conservative EF-hand structures analyzed by PROSITE tools. The homology of the second EF-hand structure was 100% between the two genes, except the first three amino acids. However, *MLC3* in fish did not discover the N-terminal sequence that was specific signs of *MLC3* in higher vertebrates. Homologous comparison of the amino acid sequences of *MLC1* and *MLC3* in *S. chuatsi* with those the other fish species revealed certain variances in amino acid composition and species-specific characterization. To investigate the relationship the gene expression and muscle formation and development, we applied a real-time PCR technique to assay the ontogenetic expression of the two genes, and the results confirmed that the *MLC1* and *MLC3* mRNA were first detected in gastrula stage and its expression gradually increased from the muscular effect stage to larval stage, especially the two genes were highly expressed in the muscle effect and larval stages, that suggested their biological functions related to muscle differentiation and muscle motility. Our study provided detail information of the two alkaline *MLC* gene structure and its function on muscle development in *S. chuatsi*.

Key words: *Siniperca chuatsi*; Alkali myosin light chain gene; cDNA library; Cloning; Ontogenetic expression