

## 鲢肌球蛋白重链球状结构域的 cDNA 克隆及结构解析

刘召静<sup>1</sup>, 陶妍<sup>1\*</sup>, 王玲军<sup>1</sup>, 党静<sup>1</sup>, 福岛英登<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2. 日本东京大学大学院农学生命科学研究科, 日本 东京 113-8657)

**摘要:**根据已经获得的两种鲢肌球蛋白重链同工型基因(低温型 sc-w 和高温型 sc-s)在 3' 端展现的明显差异,设计了 2 个特异性的反向引物,以鲤科鱼类肌球蛋白重链 5' 端的保守序列为正向引物,通过 Long-PCR 对编码鲢两种肌球蛋白重链同工型的球状结构域(Subfragment-1, S1)的全长基因进行了克隆和测序,并推断出它们一级结构的氨基酸序列。研究表明,sc-w 与 sc-s 在 S1 的初级结构上显示 80.5% 的同源性、与已经报道的草鱼低温型(gc10)有 97.2% 的高同源性;sc-s 则与草鱼中间型(gc1)和高温型(gc30)显示了分别为 98.4% 和 97.1% 的高同源性。低温型的 sc-w 和 gc10 在 S1 初级结构上展现的特有变异主要发生在 43 个氨基酸残基位点,其中 15 个属保守性残基。对 S1 区域中两个功能性的表面环 loop1(与 ATP 结合位点有关)和 loop2(与肌动蛋白结合位点有关)的结构解析发现,sc-w 和 gc10 在两个表面环的长度、残基电荷分布和氨基酸组成等方面与其它同工型之间存在明显差异,揭示了这两个表面环的结构差异可能影响了栖息于不同环境温度下的淡水鱼的肌球蛋白“分子马达”功能。分子系统树的分析结果进一步证明,鱼类栖息环境温度对其肌球蛋白同工型的基因和功能歧化的影响。

**关键词:**鲢; 肌球蛋白; S1 重链; cDNA 克隆; 氨基酸序列

**中图分类号:**Q 753; S 917

**文献标识码:**A

肌球蛋白是普遍存在于真核生物细胞中的主要结构蛋白。该蛋白占鱼肌肉肌原纤维蛋白的半数以上,它的性质主要决定了鱼肌肉的加工适性<sup>[1-2]</sup>。肌球蛋白也是产生细胞运动、细胞分裂和肌肉收缩的能量源泉,被称为机体内的“分子马达”<sup>[3-5]</sup>。传统的肌球蛋白分子由 2 个约 200 ku 的重链亚基和 4 个约 20 ku 的轻链亚基组成。每个重链亚基含有具 ATPase 活性的位于氨基端的球状头部结构域(Subfragment-1, S1)和具有粗丝形成能力的位于羧基端的含  $\alpha$ -双螺旋结构的杆状结构域<sup>[6-7]</sup>。S1 结构域自氨基端起可以被胰蛋白酶水解为 25、50 和 20 ku 3 个片段。两个表面环 loop1 和 loop2 分别位于 25 与 50 ku 片段和 50 与 20 ku 片段的连接区域,它们分别与 ATP

和肌动蛋白的结合位点有关,决定了肌球蛋白的“分子马达”功能<sup>[8]</sup>。

迄今为止,已有很多关于哺乳动物肌球蛋白研究成果的报道,证明了编码脊椎动物肌球蛋白的基因是由众多的同工型基因组成,以至于肌球蛋白有“多基因家族”之称<sup>[9-10]</sup>。然而,在鱼类肌球蛋白分子水平上的研究则起步较晚,二十世纪九十年代初,日本学者在对温度驯化淡水鱼鲤(*Cyprinus carpio*)骨骼肌肌球蛋白的研究中,发现肌球蛋白的功能性质会伴随鱼栖息环境温度的变化而变化<sup>[2,11-12]</sup>。之后,与驯化温度相关的编码鲤肌球蛋白重链的三种同工型基因被分离和测序<sup>[13-14]</sup>,根据它们的 S1 重链的氨基酸序列比对结果,发现来自于低温和高温驯化鱼的同工型之

收稿日期:2009-09-13 修回日期:2009-10-17

资助项目:上海市浦江人才基金(06PJ14081)

通讯作者:陶妍, E-mail: ytao@shou.edu.cn

间显示明显的差异,尤其体现在S1的两个功能性区域loop1和loop2<sup>[14]</sup>。近来,Morita<sup>[15]</sup>报道了两种深海鱼耶氏突吻鳕(*Coryphaenoides yakuinae*)、薄鳞突吻鳕(*Coryphaenoides armatus*)与两种非深海鱼粗鳞突吻鳕(*Coryphaenoides acrolepis*)、灰突吻鳕(*Coryphaenoides cinereus*)之间肌球蛋白S1重链氨基酸序列的比对结果,揭示了两个表面环区域均显示了多个氨基酸残基的变异,表明这两个保守性较差的区域可能影响了处于不同压力条件下的鱼的肌球蛋白功能。2004年以来,我们陆续报道了基于温度驯化的草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)肌球蛋白重链同工型基因的分离、表达和全长基因的克隆及其一级结构的解析<sup>[16-18]</sup>,并通过蛋白质水平上的研究证明了肌球蛋白重链同工型的结构与其功能之间的关系<sup>[19]</sup>。

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)与鲤和草鱼一样属于广温性的淡水鱼类,为我国四大家鱼之一,因其具有低值、高产的特点,是加工利用的主要对象。近来,我们已经报道了来自不同季节的鲢肌球蛋白在ATPase活性和热稳定性以及凝胶形成特性上的显著变化<sup>[20-22]</sup>,并在分子水平上从冬季和夏季鲢的快速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)<sup>[23]</sup>。然而,这两种基因包含了3'端的部分编码区和全部非编码区总共仅约510 bp的核苷酸序列。据此,在上述研究的基础上,本文通过Long-PCR法<sup>[24]</sup>进一步对编码鲢两种肌球蛋白S1重链同工型的全长基因进行克隆和测序,并对它们蛋白质的初级结构进行预测、比较和解析,旨在探明来自不同季节的鲢肌球蛋白ATPase活性和热稳定性发生变化的分子机理;此外,通过构建基于S1氨基酸序列的分子系统树,揭示鱼类栖息环境温度对其肌球蛋白同工型的基因和功能歧化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

鲢(体重730 g,体长40 cm)来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见方小块,用液氮快速冻结后,保存于-80℃冰箱待用。

### 1.2 总RNA提取和第一股cDNA合成

取-80℃保藏的鲢肌肉约0.4 g于50 mL离心管中,立即加入Trizol试剂(100 mg:1 mL)(Invitrogen公司,美国),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%乙醇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 μL DEPC·H<sub>2</sub>O中,-80℃保存。

第一股cDNA的合成使用Super RT Kit(天根生物科技公司,北京)。2 μL总RNA、5 μL AP通用引物(Adapter Primer)、2 μL ddH<sub>2</sub>O混匀,70℃保温10 min,冰浴1~2 min;依次加入4 μL 5×First Strand Buffer、4 μL dNTP mixture(2.5 mmol/L)、2 μL DTT(0.1 mol/L),42℃保温2 min,再加入1 μL Reverse Transcriptase(RNase H<sup>-</sup>)(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 肌球蛋白S1重链同工型基因的PCR扩增

分别以冬季和夏季鲢的第一股cDNA为模板,使用2对引物、通过Long-PCR法对编码肌球蛋白重链全长的基因进行PCR扩增(图1)。正向引物“MYH-F1”参考3种鲤肌球蛋白重链同工型基因的5'端保守区域设计(DDBJ/EMBL/GenBank:D89990、D89991、D89992);两个反向引物“sc-wR”和“sc-sR”根据已经分离获得的低温型(sc-w)和高温型(sc-s)鲢肌球蛋白重链同工型基因的3'端终止密码子上下游区域的特异性DNA差异设计(表1)<sup>[23]</sup>。Long-PCR的反应体系如下:5 μL第一股cDNA、各5 μL 10 μmol/L的正向和反向引物、2.5 μL Long Taq DNA polymerase(5 U/μL)(天根生物科技公司,北京)、10 μL 10×Long-PCR 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5 min、94℃变性30 s、68℃退火6 min、72℃延伸10 min,反应共进行30个循环。在扩增得到编码两种肌球蛋白重链同工型全长DNA的前提下,分别以两种全长DNA为模板,采用5对引物对S1重链的全长基

因进行分段扩增(图 1),5 对引物均参考 3 种鲤肌球蛋白重链同工型基因的保守区域设计(表 1)。PCR 的反应体系如下:5  $\mu$ L Long-PCR 产物、各 4  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L 的正向和反向引物、1.5  $\mu$ L *Taq* DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L)(天根生物科技公司,北京)、10  $\mu$ L 10  $\times$  *Taq* Buffer、8  $\mu$ L dNTP Mixture,用无菌水将反应液调至 100  $\mu$ L。PCR 反应条件如下:94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min、94  $^{\circ}$ C 变性 30 s、55~58  $^{\circ}$ C 退火 1 min、72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min、72  $^{\circ}$ C 终延伸 5 min,反应共进行 30 个循环。



图 1 鲢肌球蛋白 S1 重链基因的 PCR 扩增策略图

S1. 肌球蛋白重链球状结构域; S2. 肌球蛋白重链颈状结构域; LMM. 轻酶解肌球蛋白。

Fig. 1 Schematic representation of PCR amplification for myosin S1 heavy chain gene from silver carp

S1. myosin heavy chain globular head domain (subfragment-1). S2. myosin heavy chain neck domain (subfragment-2). LMM. light meromyosin.

表 1 用于 PCR 扩增的引物核苷酸序列

Tab. 1 Nucleotide sequences of primers used for PCR amplifications

引物 primer	序列 sequence
MYH-F1	5'-ATGGGAGATGGTGAAATGGAGTGTTC-3'
sc-wR	5'-CTTCAGTAAATGCTCCTTTCAAGTTTTAA-3'
sc-sR	5'-AATGGACACAGAAAACTCAACACAAGT-3'
MYH-R1	5'-GATCATCCATGCTGCATAACGCTC-3'
MYH-F2	5'-GACATGGCCATGATGACCCATCTC-3'
MYH-R2	5'-ATACGGATGACCATCCACAAGAAC-3'
MYH-F3	5'-TATCTGCTGGAGAAGTCCAGAGTG-3'
MYH-R3	5'-GATCCTTGTCTTGTCCAGCCAGC-3'
MYH-F4	5'-GCTGAGGCCCACTTCTCCCTGGTG-3'
MYH-R4	5'-GCCAGCTTCTCATCTCGCATCTCC-3'
MYH-F5	5'-TGGACACACCAAGGTGTTCTTCAA-3'
MYH-R5	5'-GAAGCCATCTCCTCAGTCAGGTTTC-3'

#### 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 pBS-T II 质粒载体(天根生物科技公司,北京)按 2:1 在 25  $^{\circ}$ C 下用  $T_4$  DNA 连接酶连接 10 min,转化感受态细胞 Top10 后,将转化菌涂于含 X-gal、

IPTG、100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基上,37  $^{\circ}$ C 培养过夜;挑取白色菌落,通过 PCR 法进行插入检验,每个平板挑选 3 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 基于肌球蛋白 S1 重链的分子系统树构建

通过 CLUSTAL W<sup>[25]</sup> 将鲢两种肌球蛋白 S1 重链的氨基酸序列与其他鱼类和哺乳动物的相应序列进行多重比较后,采用 MEGA version 3.1 软件对获得的结果进行聚类分析。根据邻接法(Neighbor-joining method)<sup>[26]</sup> 构建的分子系统树中,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相应 S1 序列如下:gc10、gcI、gc30 为草鱼 10  $^{\circ}$ C、中间、30  $^{\circ}$ C 型(EU367966、EU367967、EU367968)<sup>[18]</sup>;cc10、ccI、cc30 为鲤 10  $^{\circ}$ C、中间、30  $^{\circ}$ C 型(D89990、D89991、D89992)<sup>[14]</sup>;rockcodA1 为南极鳕(*Notothenia coriiceps*)快速肌的肌球蛋白 S1 重链(AJ243767)<sup>[27]</sup>;scallop 为大西洋扇贝(*Pecten maximus*)肌球蛋白 S1 重链(AF134172)<sup>[28]</sup>、rabbit 为家兔肌球蛋白 S1 重链(U32574)。

## 2 结果

#### 2.1 鲢肌球蛋白 S1 重链同工型基因 cDNA 克隆

首先,通过 Long-PCR 成功扩增到编码鲢低温型(sc-w)和高温型(sc-s)两种肌球蛋白重链同工型的约 6 000 bp 的全长 cDNA(图 2)。然后,分别以两种全长 cDNA 为模板,使用 5 对引物(MYH-F1, MYH-R1; MYH-F2, MYH-R2; MYH-F3, MYH-R3; MYH-F4, MYH-R4; MYH-F5, MYH-R5)成功扩增得到各 5 个 cDNA 克隆(图 1),MYH1 含 342~348 bp、MYH2 含 1 061~1 070 bp、MYH3 含 1 003 bp、MYH4 含 617~623 bp、MYH5 含 678 bp。这 5 个重叠的克隆包含了 2 499~2 502 bp 的全长肌球蛋白 S1 重链基因,其 DNA 序列已登录至 DDBJ/EMBL 基因库,sc-w 和 sc-s 的序列号分别为 GQ889366 和 GQ889367。核苷酸序列同源性的比较结果显示:鲢低温型(sc-w)与高温型(sc-s)之间的同源性仅为 78.8%(表 2);而 sc-w 与草鱼 10  $^{\circ}$ C 型(gc10)之间的同源性高达 96.9%、与中间型(gcI)和

30 ℃型 (gc30) 之间的同源性则仅为 79.3% 和 79.2%; 然而, 鲢高温型 (sc-s) 与 gcI 和 gc30 之间显示了高的同源性, 分别为 98.2% 和 97.0%。另一方面, sc-w 与冷水性的南极鳕 S1 重链 (rockcodA1) 之间显示了相对较高的同源性 (83.8%)。

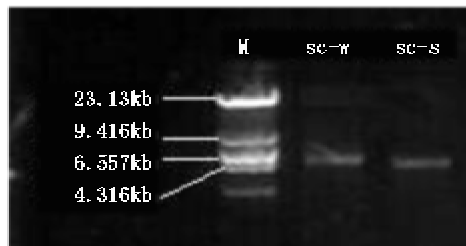


图2 编码鲢两种肌球蛋白重链同工型的全长 DNA 的 Long-PCR 扩增

Fig.2 Long-PCR amplification of complete cDNAs encoding two types of myosin heavy chain isoform from silver carp

表2 鲢与其他动物之间肌球蛋白 S1 重链同工型的 DNA 及推断的氨基酸序列的同源性

Tab.2 Identities of nucleotide and deduced amino acid sequences among the myosin S1 heavy chain isoforms from silver carp and other animals

cDNA 克隆 cDNA clone	核苷酸和氨基酸序列的同源性 (%) identities of nucleotide and deduced amino acid sequences					
	sc-s	gc10 <sup>a</sup>	gcI <sup>a</sup>	gc30 <sup>a</sup>	rockcodA1 <sup>b</sup>	rabbit <sup>c</sup>
sc-w	78.8 <sup>d</sup> (80.5) <sup>e</sup>	96.9 (97.2)	79.3 (81.0)	79.2 (80.8)	83.8 (86.8)	76.6 (77.2)
sc-s		78.5 (80.4)	98.2 (98.4)	97.0 (97.1)	77.8 (79.6)	76.4 (81.2)

注: sc-w、sc-s 代表两种鲢肌球蛋白重链同工型; gc10、gcI 和 gc30 代表 3 种草鱼肌球蛋白重链同工型; rockcodA1 代表南极鳕鱼肌球蛋白重链同工型; rabbit 代表家兔肌球蛋白重链同工型。a. 引自 Tao 等<sup>[18]</sup>; b. 引自 Gauvry 等<sup>[27]</sup>; c. 引自 DDBJ/EMBL/GenBank (U32574); d. 核苷酸同源性; e. 氨基酸同源性。

Notes: sc-w and sc-s are the two types of myosin heavy chain isoform from silver carp. gc10, gcI and gc30 are the three types of myosin heavy chain isoform from grass carp; rockcodA1 is Antarctic rockcod myosin heavy chain isoform; rabbit is *Oryctolagus cuniculus* myosin heavy chain isoform; a. data from Tao *et al.*<sup>[18]</sup>; b. data from Gauvry *et al.*<sup>[27]</sup>; c. data from the DDBJ/EMBL/GenBank database accession number U32574; d. nucleotide identity; e. amino acid identity.

### 2.3 鲢肌球蛋白 S1 重链的两个表面环 loop1 和 loop2 的氨基酸组成比较

肌球蛋白 S1 重链被胰蛋白酶水解后形成的 3 个片段 (25、50、20 ku) 分别以方框表示 (图 3)。连接 25 和 50 ku 片段的区域在空间结构上可形成一个表面环 loop1, 它邻近 ATP 结合位点, 在此区域附近存在一段连接  $\beta$ -折叠结构的高度保守的氨基酸序列<sup>[8]</sup>。据此, 由图 3 可见, 自氨基端起 177~199 的残基区域显示了高度的保守性, 尤其是以灰色阴影框显示的富含甘氨酸的 GESGAGKT 序列, 被认为是磷酸结合位点<sup>[14]</sup>。4 个下划线区域在空间结构上形成了与肌动蛋白结合的位点<sup>[29-30]</sup>, 其中仅连接 50 和 20 ku 片段的

### 2.2 鲢肌球蛋白 S1 重链同工型的初级结构比较

鲢 sc-w 和 sc-s 的 S1 重链分别由 834 和 833 个氨基酸残基组成, 与草鱼的 3 种肌球蛋白 S1 重链相似 (图 3)。两种 S1 重链的分子量分别是 95268 和 94635。氨基酸序列同源性的比较结果与上述核苷酸序列的比较结果相似, sc-w 与草鱼 gc10 之间显示了高的同源性 (97.2%), 而 sc-s 与 gcI 和 gc30 之间的同源性分别高达 98.4% 和 97.1% (表 2)。值得注意的是, sc-w 与非鲤科鱼类的冷水性南极鳕 rockcodA1 之间有较高的同源性 (86.8%), 而 sc-s 则与温血性的哺乳动物家兔之间显示 81.2% 的同源性。sc-w 和 gc10 与其它同工型之间在肌球蛋白 S1 重链初级结构上的差异与 43 个氨基酸残基的变异有关 (图 3, 黑色阴影框), 其中 15 个残基相对于其他同工型属于保守性残基 (黑色阴影框带星号)。

区域显示了频繁的氨基酸变异, 且富含甘氨酸和赖氨酸, 该区域被称为表面环 loop2。

图 4 显示了鲢、草鱼、南极鳕以及家兔肌球蛋白 S1 重链内 loop1 和 loop2 的氨基酸组成比较。就 loop1 而言, sc-w 与 gc10 显示了高的同源性, 且它们氨基酸残基的电荷分布相同; sc-s 则与 gcI 和 gc30 有完全相同的氨基酸组成, 且均含有 3 个脯氨酸残基, 但 sc-w 和 gc10 则不含。各同工型之间在 loop2 的氨基酸同源性比较上亦显示了与 loop1 相似的趋势。应该注意到, 无论 loop1 还是 loop2, 均显示了鲤科鱼类的低温型和高温型分别与南极鳕鱼和家兔有较相似的氨基酸组成。

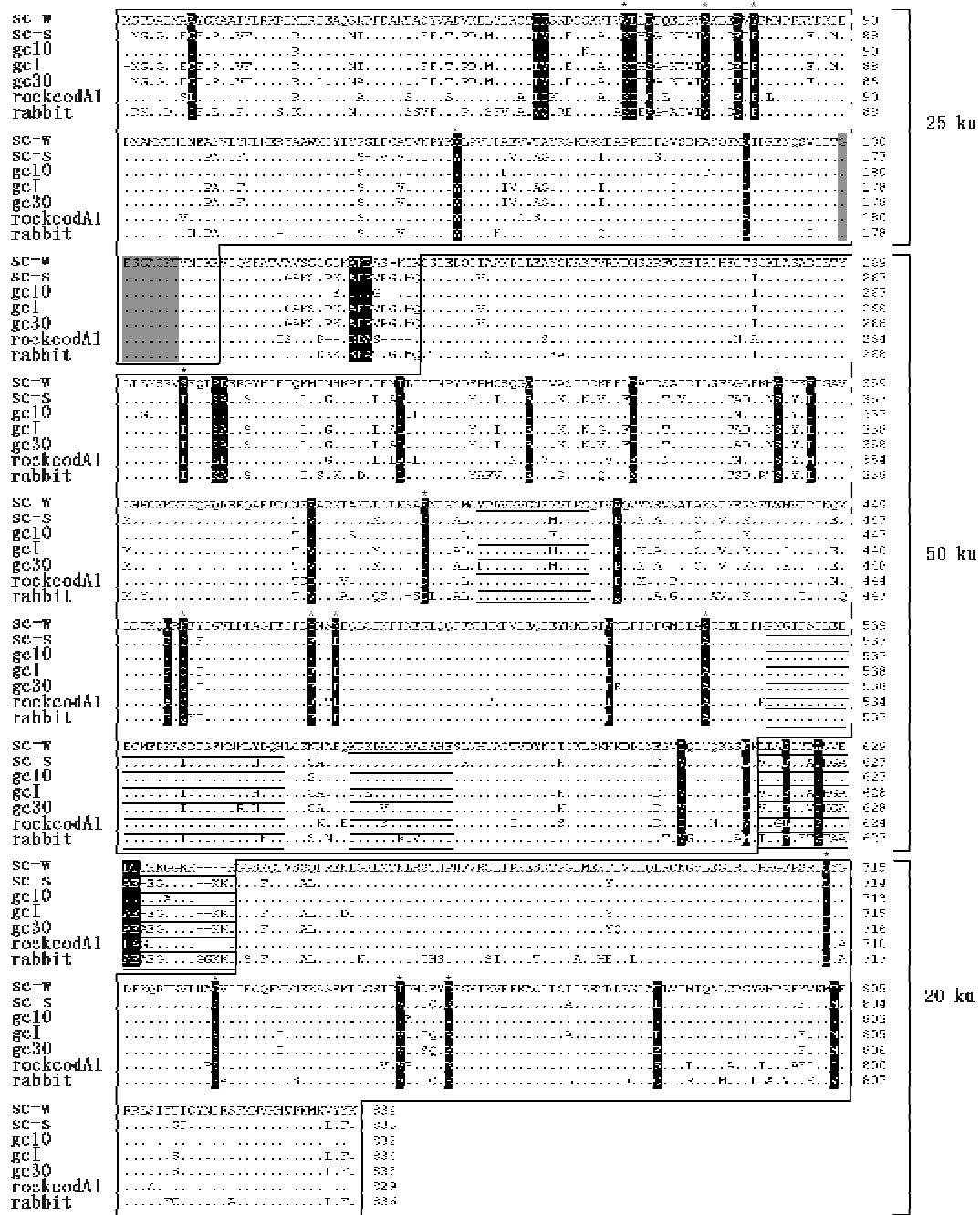


图3 鲢与其他动物之间肌球蛋白 S1 重链同工型的初级结构比较

点表示与 sc-w 相同的氨基酸残基;3 个方框表示 S1 重链被胰蛋白酶水解的 3 个片段;黑色阴影框表示 sc-w 和 gc10 发生特有变异的氨基酸残基;星号表示保守性残基位点;灰色阴影框表示 ATP 结合位点附近的连接 β-折叠结构的保守区域;4 个下划线区域表示与肌动蛋白结合的位点。

Fig. 3 Comparison in the primary structures among the myosin S1 heavy chain isoforms from silver carp and other animals

Amino acids identical to those of sc-w S1 heavy chain are shown by dots. The three fragments produced by tryptic digestion of S1 heavy chain are boxed. Mutational residue sites relative to sc-w and gc10 are shaded in dark. Stars represent the conserved residues. A highly conserved region connecting β-sheets that surround the ATP-binding pocket is shaded in gray. The four major contact regions interacting with actin are underlined.

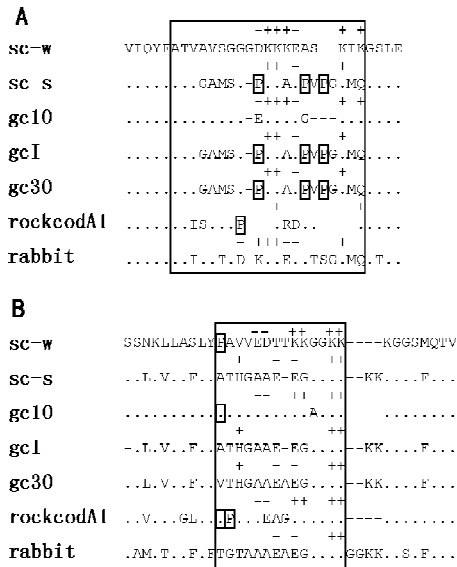


图4 鲢与其他动物之间 loop1 (A) 和 loop2 (B) 区域的氨基酸组成比较

点表示与 sc-w 相同的氨基酸残基;大方框表示 S1 重链的两个表面环区域;小方框表示脯氨酸;“+”和“-”代表带电荷的氨基酸残基。

Fig. 4 Comparisons in the amino acid composition around loop 1 (A) and loop 2 (B) regions between silver carp and other animals

Amino acids identical to those of sc-w S1 heavy chain are shown by dots. Big boxes represent two surface loops of S1 heavy chain. Small boxes represent proline. “+” and “-” represent amino acids with charge.

2.4 分子系统树分析

基于肌球蛋白 S1 重链的氨基酸序列构建的分子系统树主要由两大分支组成,其自引导值为 94%;在第一个大分支中,sc-s、gc1、gc30 和 cc30 形成了一个组,它们之间享有更近的基因距离,sc-s 来自于夏季鲢<sup>[23]</sup>、gc1 和 gc30 来自于 30 °C 驯化的草鱼<sup>[16]</sup>、cc30 则来自于 30 °C 驯化的鲤<sup>[13]</sup>;与之产生歧化的小组由 cc10 和 cc1 组成,两者均从 10 °C 驯化的鲤快速肌中分离获得<sup>[13]</sup> (图 5)。在第二个大分支中,来自于冬季鲢和 10 °C 驯化草鱼的 sc-w 和 gc10 以及冷水性南极鳕鱼的 rockcodA1 组成了一组,表明它们之间的基因距离较近,它们与非脊椎动物扇贝一起产生了与哺乳动物家兔之间的基因歧化,其自引导值为 94%。

3 讨论

实验比较和解析了鲢两种肌球蛋白 S1 重链同工型的初级结构,并与其它鲤科鱼类、冷水性的

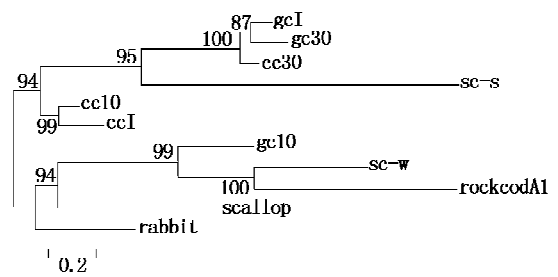


图5 基于鲢和其他动物的肌球蛋白 S1 重链氨基酸序列构建的分子系统树

Fig. 5 Phylogenetic analysis based on the amino acid sequences of S1 heavy chain from silver carp and other animals

海水鱼类和哺乳动物的相关 S1 同工型进行了比较。结果显示:来自低温栖息环境的淡水鱼肌球蛋白 S1 重链同工型之间具有更相似的初级结构 (图 3、表 2),其中,鲢 sc-w 与草鱼 gc10 的氨基酸同源性高,两者与鲤科鱼类的其它同工型组成的大分支之间产生了相对较远的基因距离 (图 5),这样的基因歧化进一步由 sc-w 和 gc10 在 S1 重链的 43 个氨基酸残基上的特有变异所证明,甚至其中 15 个是保守性的残基位点。另一方面,来自于高温栖息环境的淡水鱼肌球蛋白 S1 重链同工型之间显示更近的基因距离。上述研究结果似乎证明了属于变温动物的鱼类其肌球蛋白 S1 重链的初级结构会伴随鱼体的温度而变化,该推测符合对于草鱼和鲤肌球蛋白的研究报道<sup>[1,14,17-18]</sup>。

众所周知,担负肌球蛋白“分子马达”功能的 S1 重链含有 ATP 和肌动蛋白结合位点,与这两个位点相关的是 loop1 和 loop2 两个表面环;不同类型的 S1 重链在两个环的氨基酸组成上具有相当高的变异度<sup>[8,31-32]</sup>。本文研究发现,来自鲢和草鱼 3 个高温型 (sc-s、gc1、gc30) 的 loop1 以及来自家兔的 loop1 区域的长度比那些低温型的 loop1 多 1-6 个残基,且前 3 种高温型均含有 3 个脯氨酸残基,但低温型的 sc-w 和 gc10 则不含 (图 4-A)。Gauvry 等<sup>[27,33]</sup>曾报道 loop1 的长度影响了 ATP 的结合,而存在于 loop1 中的脯氨酸可能与 ATP 水解的效率有关,它增加了 loop1 的稳定性。这样,可以认为低温型的 sc-w 和 gc10、甚至于南极鳕的 loop1 缺乏较稳定的结构、其可变性更高,必须通过一些氨基酸残基的变异才能行使 ATPase 的功能。就 loop2 而言,位于羧基端

的赖氨酸残基是高度保守的,它能够与位于肌球蛋白氨基端结构域的带负电荷的残基相互作用<sup>[34]</sup>。虽然本文中所有 S1 重链同工型的 loop2 在它们的羧基端亦显示了保守的赖氨酸残基,但低温型与高温型之间在氨基酸残基的电荷分布上显示了不同(图 4-B)。Hirayama 等<sup>[35]</sup>利用鲤 10 ℃型(cc10)和 30 ℃型(cc30)肌球蛋白 S1 重链 loop2 的编码序列与盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)的肌球蛋白基因构建了嵌和重组体 DNA,并进行了成功的表达。对于嵌合蛋白的功能测定证明了 loop2 序列的可变性影响了肌球蛋白激活的肌球蛋白 Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性。

我们已经在化学反应的热力学理论上证明了鲢肌球蛋白 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 的热稳定性与季节温度变化之间的关系,即来自于春夏季鲢的肌球蛋白 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 的热变性速率常数( $K_D$ )明显低于秋冬季鲢的<sup>[20]</sup>;此外,通过半定量 RT-PCR 实验,证明了 sc-w 主要在秋、冬季的鲢肌肉中表达,而 sc-s 则主要在春、夏季的鲢肌肉中表达<sup>[23]</sup>。据此,本文对于鲢两种肌球蛋白 S1 重链初级结构的比较和解析结果可以表明:在低温栖息环境的鱼肌肉中表达的肌球蛋白 S1 重链同工型在某些氨基酸残基上的特有变异,尤其是在两个表面环的长度、氨基酸组成和电荷分布上产生的变异可能对低温栖息的淡水鱼维持其肌球蛋白的“分子马达”功能起了非常关键的作用,进而揭示了鱼类的栖息环境温度对其肌球蛋白的基因和功能歧化的影响。

#### 参考文献:

- [1] Watabe S. Temperature plasticity of contractile proteins in fish muscle [J]. *J Exp Biol*, 2002, 205: 2231 - 2236.
- [2] Hwang G C, Watabe S, Hashimoto K. Changes in carp myosin ATPase induced by temperature acclimation [J]. *J Comp Physiol B*, 1990, 160: 233 - 239.
- [3] Cheney R E, Riley M A, Mooseker M S. Phylogenetic analysis of the myosin superfamily [J]. *Cell Motil Cytoskelet*, 1993, 24: 215 - 223.
- [4] 舒适, 阎隆飞. 肌球蛋白研究进展 [J]. *生命的化学*, 1999, 19(2): 65 - 68.
- [5] Rayment I, Rypniewski W R, Schmidt-Base K, et al. Three-dimensional structure of myosin sub-fragment-1; a molecular motor [J]. *Science*, 1993, 261: 50 - 58.
- [6] Harrington W F, Rodgers M E. Myosin [J]. *Ann Rev Biochem*, 1984, 53: 35 - 73.
- [7] Craig R, Woodhead J L. Structure and function of myosin filaments [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2006, 16: 204 - 212.
- [8] Spudich J A. How molecular motors work [J]. *Nature*, 1994, 372: 515 - 518.
- [9] Pette D, Staron R S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles [J]. *Histochem Cell Biol*, 2001, 115: 359 - 372.
- [10] Diffie G M, Mc Cue S, Larosa A, et al. Interaction of various mechanical activity models in regulation of myosin heavy chain isoform expression [J]. *J Appl Physiol*, 1993, 74: 2517 - 2522.
- [11] Hwang G C, Ochiai Y, Watabe S, et al. Changes of carp myosin subfragment-1 induced by temperature acclimation [J]. *J Comp Physiol B*, 1991, 161: 141 - 146.
- [12] Guo X F, Nakaya M, Watabe S. Myosin subfragment-1 isoforms having different heavy chain structures from fast skeletal muscle of thermally acclimated carp [J]. *J Biochem*, 1994, 116: 728 - 735.
- [13] 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.
- [14] Hirayama Y, Watabe S. Structural differences in the crossbridge head of temperature-associated myosin subfragment-1 isoforms from carp fast skeletal muscle [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 246: 380 - 387.
- [15] Morita T. Comparative sequence analysis of myosin heavy chain proteins from congeneric shallow- and deep-living rattail fish (genus *Coryphaenoides*) [J]. *J Exp Biol*, 2008, 211: 1362 - 1367.
- [16] 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 B*, 2004, 139: 649 - 656.
- [17] Wang S Y, Tao Y, 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 B*, 2008, 143: 378 - 387.
- [18] Tao Y, Wang S Y, Liang C S, et al. Structural differences in the motor domains of temperature-associated myosin heavy chain isoforms from grass

- carp fast skeletal muscle [ J ]. *Comp Biochem Physiol B*, 2009, 154: 248 - 254.
- [ 19 ] Tao Y, 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.
- [ 20 ] 韩黎, 陶妍, 汪之和. 淡水鱼肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 热稳定性的季节变化 [ J ]. *上海水产大学学报*, 2007, 16(4): 362 - 367.
- [ 21 ] 韩黎, 陶妍, 汪之和. 草鱼和鲢肌球蛋白  $\text{Ca}^{2+}$ -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.
- [ 22 ] 董永, 陶妍. 淡水鱼骨骼肌肌球蛋白热稳定性及凝胶化特性的季节变化 [ J ]. *食品工业科技*, 2008, 29(7): 124 - 127.
- [ 23 ] 党静, 陶妍, 王孙勇, 等. 鲢骨骼肌肌球蛋白重链基因的 cDNA 克隆与表达 [ J ]. *水生生物学报*, 2010, 34(1): 215 - 219.
- [ 24 ] Emonet S, Grard G, Brisbarre N, *et al.* LoPPS: a long PCR product sequencing method for rapid characterisation of long amplicons [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344: 1080 - 1085.
- [ 25 ] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice [ J ]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 4673 - 4680.
- [ 26 ] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [ J ]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406 - 425.
- [ 27 ] Gauvry L, Ennion S, Ettelaie C, *et al.* Characterisation of red and white muscle myosin heavy chain gene coding sequences from Antarctic and Tropical fish [ J ]. *Comp Biochem Physiol B*, 2000, 127: 575 - 588.
- [ 28 ] Janes D P, Patel H, Chantler P D. Primary structure of myosin from the striated adductor muscle of the Atlantic scallop, *Pecten maximus*, and expression of the regulatory domain [ J ]. *J Muscle Res Cell Motil*, 2000, 21(5): 415 - 422.
- [ 29 ] Sweeney H L, Straceski A J, Leinwand L A, *et al.* Heterologous expression of a cardiomyopathic myosin that is defective in its actin interaction [ J ]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 1603 - 1605.
- [ 30 ] Sellers J R, Goodson H V. Motor proteins 2: myosin [ J ]. *Protein Profile*, 1995, 2: 1323 - 1423.
- [ 31 ] Uyeda T Q P, Ruppel K M, Spudich J A. Enzymatic activities correlate with chimeric substitutions at the actin-binding face of myosin [ J ]. *Nature*, 1994, 368: 567 - 569.
- [ 32 ] Murphy C T, Spudich J A. *Dictyostelium* myosin 25 - 50 loop substitutions specifically affect ADP release rates [ J ]. *Biochemistry*, 1998, 37: 6738 - 6744.
- [ 33 ] Gauvry L, Mohan-Ram V, Ettelaie C, *et al.* Molecular motors designed for different tasks and to operate at different temperatures [ J ]. *J Therm Biol*, 1997, 6: 367 - 373.
- [ 34 ] Joel P B, Trybus K M, Sweeney H L. Two conserved lysines at the 50/20 ku junction of myosin are necessary for triggering actin activation [ J ]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 2998 - 3003.
- [ 35 ] Hirayama Y, Sutoh K, Watabe S. Structure-function relationships of the two surface loops of myosin heavy chain isoforms from thermally acclimated carp [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 269: 237 - 241.



## cDNA cloning and structural analysis of the globular head for myosin heavy chain from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)

LIU Zhao-jing<sup>1</sup>, TAO Yan<sup>1\*</sup>, WANG Ling-jun<sup>1</sup>, DANG Jing<sup>1</sup>, FUKUSHIMA Hideto<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan)

**Abstract:** In the previous study, we reported that two types of myosin heavy chain isoform genes were isolated from fast skeletal muscles of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) acclimatized in winter and summer, and named the low temperature-type(sc-w) and the high temperature-type(sc-s), respectively. In this study, two gene-specific reverse primers were designed according to the striking differences in the nucleotide sequences of 3'-terminals between the two types of silver carp myosin heavy chain isoform, and a forward primer was designed with reference to conserved nucleotide sequences in 5'-terminal of cyprinidae. Long-PCR was performed to amplify the complete cDNAs encoding myosin subfragment-1 (S1) heavy chains for the two types of isoform. DNA sequencing of both strands was carried out, and the amino acid sequences for the two types of myosin S1 heavy chain were deduced. The results showed that the primary structure of myosin S1 heavy chain produced 80.5% identity between sc-w and sc-s. Whereas a high sequence identity of 97.2% was found between sc-w and gc10, which was reported to be isolated from 10 °C-acclimated grass carp. In contrast, the amino acid sequence of S1 heavy chain for sc-s revealed much higher identity to those of gcI(98.4%) and gc30(97.1%), which were isolated from 30 °C-acclimated grass carp. Compared with the other myosin S1 heavy chain isoforms, isoform-specific differences for sc-w and gc10 were clearly observed in 43 amino acid residues. Furthermore, among these amino acid mutations, 15 mutations occurred at the conserved residue sites. Additionally, sc-w and gc10 showed striking differences compared with the other S1 heavy chain isoforms in the two surface loops, loop 1 located near the ATP-binding domain and loop 2, which is one of the actin binding domains, suggesting that the changes in the flexibility of two surface loops were caused by modulations in length, amino acid composition and charge can play an important role in adaptation of motor function to low environmental temperature. Phylogenetic analysis further demonstrated the effects of environmental temperature on genomic divergence and functional evolution of fish myosin isoforms.

**Key words:** silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*); myosin; S1 heavy chain; cDNA cloning; amino acid sequence

**Corresponding author:** TAO Yan. E-mail: ytao@shou.edu.cn