

# 黄河裸裂尻鱼肌酸激酶M-CK cDNA的克隆及组织表达分析

孔庆辉<sup>①</sup> 晁燕<sup>①</sup> 夏明哲<sup>①</sup> 李长忠<sup>②</sup> 祁得林<sup>①\*</sup>

① 青海大学农牧学院动物科学系 西宁 810016; ② 青海大学生态环境工程学院 西宁 810016

**摘要:** 肌酸激酶 (CK) 能够催化磷酸基在二磷酸腺苷 (ADP) 和磷酸肌酸之间的可逆性转移, 在细胞能量代谢过程中发挥重要作用。本研究利用 RT-PCR 和 RACE 方法克隆了黄河裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis pylzovi*) 肌酸激酶基因全长 cDNA 序列, 并进行了生物信息学分析和系统发育关系研究。黄河裸裂尻鱼肌酸激酶 cDNA 全长 1 599 bp, 开放阅读框 (ORF) 1 143 bp, 编码 380 个氨基酸, 具有典型的 N-端结构域和 C-端催化结构域。氨基酸序列同源性分析表明, 黄河裸裂尻鱼肌酸激酶与斑马鱼 (*Danio rerio*) 和鲤 (*Cyprinus carpio*) M3-CK 有较高的同源性, 其序列一致度达 94% 以上。系统发育分析显示, 黄河裸裂尻鱼肌酸激酶与斑马鱼和鲤的 M3-CK 聚在一支, 形成一个单系群, 初步判定克隆获得的黄河裸裂尻鱼肌酸激酶基因可能与鲤和斑马鱼 M3-CK 是直系同源基因。利用 Real-time PCR 方法检测和分析了黄河裸裂尻鱼主要组织肌酸激酶 mRNA 表达水平, 肌肉、肠、眼、心中肌酸激酶转录本表达较高, 在肝脏和脑中表达微弱。肌酸激酶在肌肉、肠、和心中高表达与其能量代谢功能相适应, 而在眼组织中的高表达是否与肌酸激酶的其他功能相关, 有待于进一步研究。

**关键词:** 黄河裸裂尻鱼; 肌酸激酶; 基因克隆; 表达

**中图分类号:** Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2016) 01-84-11

## cDNA Cloning and Tissue Expression of Creatine Kinase Gene from Huanghe Schizothoracin (*Schizopygopsis pylzovi*)

KONG Qing-Hui<sup>①</sup> CHAO Yan<sup>①</sup> XIA Ming-Zhe<sup>①</sup> LI Chang-Zhong<sup>②</sup> QI De-Lin<sup>①\*</sup>

① Animal Science Department of Agriculture and Animal Husbandry College, Qinghai University, Xining 810016; ② College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, China

**Abstract:** Creatine kinase (CK) plays an important role in the process of cell energy metabolism by catalyzing the reversible transfer of phosphate group between adenosine diphosphate (ADP) and phosphocreatine. This study aimed to investigate the characteristics of creatine kinase gene and its expression patterns in tissues. The cDNA full-length of the creatine kinase gene from Huanghe schizothoracin

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 31160226, 31460094);

\* 通讯作者, E-mail: delinqi@126.com;

**第一作者介绍** 孔庆辉, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物分子生物学; E-mail: kc1008611@163.com.

收稿日期: 2015-07-13, 修回日期: 2015-10-13 DOI: 10.13859/j.cjz.201601010

(*Schizopygopsis pylzovi*) was cloned using RT-PCR and RACE methods, and then the bioinformatics analysis was conducted. The results showed that the full-length cDNA of CK gene was 1 599 bp, including a 1 143 bp complete. Open reading frame (ORF) encoding 380 amino acid peptide. The creatine kinase of Huanghe schizothoracin contains a N-terminal domain and a C-terminal catalysis domain. Sequence homologous analysis of amino acids showed that the CK of Huanghe schizothoracin has high homology with the M3-CK of zebra fish (*Danio rerio*) and carp (*Cyprinus carpio*), with the identity reaching above 94% (Table 1). Phylogenetic analysis showed that the CK of Huanghe schizothoracin and the M3-CK of zebra fish and carp were clustered together and formed a monophyletic group (Fig. 3), from which the CK of Huanghe schizothoracin could be tentatively identified as the orthologous gene of the M3-CK of zebra fish and carp. The mRNA levels of major tissues from six individuals of Huanghe schizothoracin were detected and analyzed using Quantitative Real-time PCR. The result showed that the CK transcript was highly expressed in muscle, intestine, eye and heart, while weakly expressed in hepatopancreas and brain (Fig. 4). In conclusion, the high expression of CK in muscle, intestine and heart is consistent with its function in cell energy metabolism, but its high expression in eyes may be related to other functions, which needs to further researches.

**Key words:** Huanghe schizothoracin, *Schizopygopsis pylzovi*; Creatine kinase; Gene cloning; Expression

肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 能够催化二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 和磷酸肌酸 (creatine phosphate, CP) 之间磷酸基的可逆转移 (石耀华等 2003), 是一个存在于动物脑、心及骨骼肌的细胞浆和线粒体中的重要激酶, 与细胞内能量转运代谢及肌肉收缩密切相关 (Hammerschmidt et al. 2000, Abraham et al. 2002, Spindler et al. 2002)。肌酸激酶不仅参与能量代谢, 还与个体发育中肌肉的生长有密切联系 (Weintraub et al. 1991, Olson et al. 1995, Ríos et al. 2002)。高等脊椎动物肌酸激酶包括胞质型 (cytosolic form) 和线粒体型 (mitochondrial form) 两大类。胞质型肌酸激酶又分为肌型肌酸激酶 (muscle-type creatine kinase, M-CK) 和脑型肌酸激酶 (brain-type creatine kinase, B-CK)。线粒体型肌酸激酶 (mitochondrion-type creatine kinase, mt-CK) 也包括 2 种类型, 即存在于线粒体膜间隙的肌酸激酶 (ubiquitous Mi-CK) 和存在于肌节的肌酸激酶 (sarcomeric Mi-CK)。尽管高等脊椎动物因种属差异所表达的肌酸激酶类型亦有所不同, 但是所有肌酸激酶异构体均有 2 个非常保

守结构域, 即 N-端结构域和 C-端催化结构域, 所以均能可逆地催化三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 的磷酸基团转移到肌酸的胍基上生成二磷酸腺苷 (ADP) 和磷酸肌酸 (CP) (Mühlebach et al. 1994)。

就肌型肌酸激酶而言, 真骨鱼类因物种不同而有差异, 如在鲨鱼 (*Ginglymostoma cirratum*) (Gray et al. 1986)、鳕鱼 (*Gadous macroceph*) (Petrova et al. 1988)、电鳗 (*Electrophorus electricus*) (Batista et al. 2000)、斑马鱼 (*Danio rerio*) (Harder et al. 2001)、银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) (石耀华等 2003)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) (Chen et al. 2010) 和鳊 (*Siniperca chuatsi*) (张敏等 2010) 中现只分离出 1 种肌型肌酸激酶 (M-CK); 在鲈鱼 (*Ictalurus punctatus*) (Liu et al. 2001) 和大西洋鲑 (*Salmo salar*) (Andreassen et al. 2009) 中分离出 2 种不同的肌型肌酸激酶 (M-CK); 而在鲤 (*Cyprinus carpio*) 分离到 3 种不同的肌型肌酸激酶 (M-CK), 这 3 种肌型肌酸激酶 (M-CK) 主要在肌肉中表达, 在心中微弱表达, 在脑、肾、鳃和肝中未见表达 (Sun

et al. 2002)。肌型肌酸激酶 (M-CK) 不仅与骨骼肌、平滑肌和心肌细胞内能量转运、能量代谢、肌肉收缩密切相关, 而且在个体发育过程中发挥重要作用, 如与斑马鱼 (Harder et al. 2001) 的肌肉生长和牙鲈 (Chen et al. 2010) 的变态反应相关。

黄河裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis pylzovi*) 隶属鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae), 在青藏高原东北部黄河干支流和湖泊以及柴达木水系中广泛分布 (武云飞等 1992), 具有耐低氧、耐低温的生物学特征。黄河裸裂尻鱼常栖息于水底砾石较多、水流缓慢、水质清澈的水域, 以浮游动植物或底栖动植物为主要食料, 在青藏高原淡水生态系统的食物链中具有不可或缺的地位。同其他裂腹鱼亚科鱼类一样, 黄河裸裂尻鱼具有性成熟迟、繁殖力低、生长期短、生长缓慢的典型生物学特性, 加之受人类干扰和环境恶化的影响, 近年来黄河裸裂尻鱼种群数量锐减, 栖息水域明显萎缩 (武云飞等 1992, Qi et al. 2007)。

截至目前, 有关鱼类肌酸激酶的研究报道较多 (West et al. 1984, Harder et al. 2001, Liu et al. 2001, Sun et al. 2002, 张敏等 2010), 但针对裂腹鱼亚科鱼类肌酸激酶的研究仍处于起步阶段。本研究通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆了黄河裸裂尻鱼肌酸激酶基因全长 cDNA, 并通过 Real-time PCR 方法初步检测了肌酸激酶基因 mRNA 在不同组织中的表达差异, 为进一步研究高原鱼类由肌酸激酶介导的能量代谢和调控奠定分子基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样本采集** 黄河裸裂尻鱼共 6 尾, 采集于青海省大通县湟水河支流——宝库河 (37°14'24.72"N, 101°28'36.12"E), 将野外采集得到的样品迅速分离所需组织, 立即冻存于液氮中, 后转移至 -80℃ 冰箱中备用。

**1.1.2 试剂** 动物组织总 RNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒、FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒 (去基因组) 均为天根生化科技有限公司产品; SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit、Advantage 2 Polymerase Mix 为 Clontech Laboratories, Inc. 产品; pMD19-T 载体、DH5 $\alpha$  感受态细胞、TaKaTa RNA PCR™ Kit (AMV) Ver.3.0、Premix Ex Taq® Version 2.0 均为大连宝生物有限公司产品; SuperReal 荧光定量预混试剂盒 (SYBR Green)。

### 1.2 方法

**1.2.1 肌肉组织总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成** 利用动物组织总 RNA 提取试剂盒提取黄河裸裂尻鱼肌肉总 RNA。cDNA 第一链的合成使用 TaKaTa RNA PCR™ Kit (AMV) Ver.3.0 试剂盒, 以肌肉组织总 RNA 为模板, Oligo dT 为反转录引物, 按试剂盒推荐方法进行。

**1.2.2 引物设计与合成** 根据 GenBank 登录的斑马鱼 (AY260853) 和鲤 (AF055290) 的肌酸激酶基因序列设计引物 MCK3-2F 和 MCK3-2R (表 1), 用于扩增肌酸激酶 (CK) cDNA 核心片段 (约 1 280 bp)。根据测序所得的黄河裸裂尻鱼肌酸激酶 cDNA 核心片段及试剂盒要求分别设计 5'RACE 引物 MCKrace5R1 和 3'RACE 引物 MCKrace3F1 (表 1)。将肌酸激酶 cDNA 全长序列拼接后, 根据肌酸激酶全长序列设计半定量 Real-time PCR 引物 MCKrealF1 和 MCKrealR1。根据 GAPDH 基因序列, 设计引物 GAPDHF 和 GAPDHR, 作为 Real-time PCR 的内标 (晁燕等 2012, 赵兰英等 2012)。

**1.2.3 肌酸激酶 cDNA 核心片段的扩增** PCR 扩增利用 Premix Ex Taq® Version 2.0 试剂盒, 以肌肉 cDNA 为模板, PCR 扩增程序, 94℃ 预变性 3 min, 98℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 35 循环, 最后 72℃ 续延伸 5 min (晁燕等 2011)。PCR 扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳后, 用胶回收试剂盒进行回

表 1 黄河裸裂尻鱼肌酸激酶基因克隆及分析引物

Table 1 Primers for creatine kinase gene cloning and analysis in Huanghe schizothoracin

引物 Primers	序列 Sequences (5' - 3')	用途 Usage
MCK3-2F	GACTAAGAACTGCAACAACG	RT-PCR
MCK3-2R	GACAACAGGGAAGAAAGGAA	RT-PCR
MCKrace5R1	GGGTTGACTTGCTCCTCAGTTTGT	5'RACE-PCR
MCKrace3F1	GCGTCTTCAGAAGCGTGGCACAG	3'RACE-PCR
MCKrealF1	AATAATCCAGTCCCAGCCGAAG	Real-time PCR
MCKrealR1	CCAACAGCCGTGGTGAGCGTAGA	Real-time PCR
GAPDHF	GCGAGCCATGCCAGCAGACAA	Real-time PCR
GAPDHR	GTGAAAACACCAGTAGACTCCACAACA	Real-time PCR

收纯化, 然后克隆至 pMD19-T 载体中, 转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , PCR 检测阳性克隆, 送生工(上海)生物有限公司进行测序。

#### 1.2.4 肌酸激酶 cDNA 5'末端和 3'末端的克隆

RACE 采用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 和 Advantage 2 Polymerase Mix, 按其推荐方法进行扩增, 产物经纯化和克隆后进行测序。

#### 1.2.5 RT-PCR 和 Real-time PCR 法检测各组

组织表达特征 黄河裸裂尻鱼 6 尾, 分别取脑、心、肝胰脏、肌肉、肾、眼、肠和鳃共 8 种组织, 提取总 RNA, 利用 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒反转录合成 cDNA。首先, 利用 RT-PCR 方法初步确定肌酸激酶基因在各组织中的表达情况。然后, 依照 SuperReal 荧光定量预混试剂盒进行 Real-time PCR 分析。Real-time PCR 反应体系 20  $\mu$ l: 2  $\times$  SuperReal PreMix Plus 10  $\mu$ l、上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.6  $\mu$ l、cDNA 模板 1  $\mu$ l (0.1 g/L)、ddH<sub>2</sub>O 8.4  $\mu$ l。Real-time PCR 时, 每份样品重复 3 次, 结果采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析 (Livak et al. 2001)。

#### 1.2.6 生物信息学分析

利用 Blastx 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行蛋白质相似性搜索; Lasergene 7.0 (Burland 2000) 软件对所克隆的基因序列进行阅读框分析、氨基酸序列推定; ExPASy - Tools (<http://www.expasy.ch/tools/>) 对肌酸激酶蛋白的生化特性和蛋白质功能位点进行预测和分析; DNAMAN

Version 6.0 (<http://www.lynnon.com>) 进行氨基酸序列同源性比较; 利用 MEGA3.1 (Kumar et al. 2004) 软件构建邻接 (neighbor-joining, NJ) 系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄河裸裂尻鱼肌酸激酶全长 cDNA 克隆及氨基酸序列分析

MCK3-2F和MCK3-2R引物扩增获得一条 1 300 bp左右的条带, 与预期肌酸激酶cDNA核心片段大小相符 (图1a); 以引物MCKrace5R1和通用引物UPM进行5'RACE扩增, 在250 ~ 300 bp间获得一条与预期大小相符的条带, 测

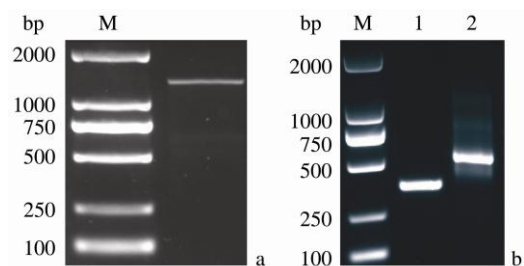


图 1 肌酸激酶基因cDNA序列扩增结果

Fig. 1 The PCR results of cDNA sequence of creatine kinase gene

a. cDNA核心序列; b. 5'RACE和3'RACE产物, 其中, 1为5'RACE产物, 2为3'RACE产物。

a. Major fragment of cDNA sequence; b. 5'RACE and 3'RACE products, 1 represents 5'RACE product, 2 represents 3'RACE product.

序后实际大小为280 bp (图1b); 以引物 MCKrace3F1 和通用引物UPM进行3'RACE扩增, 在500 ~ 750 bp间获得一条与预期大小相符的条带, 测序后实际大小为518 bp (图1b)。核心片段、5'RACE和3'RACE产物测序后拼接获得肌酸激酶全长cDNA序列。

黄河裸裂尻鱼肌酸激酶cDNA全长为1 599 bp, 其中开放阅读框(open reading frame, ORF) 1 143 bp, 能够编码380个氨基酸; 5'-端非编码区(5'-UTR)的大小为142 bp, 3'-端非编码区(3'-UTR)的大小为314 bp, 具有典型的多聚腺苷酸加尾信号序列(AATAAA)和polyA尾。起始密码子为ATG, 终止密码子为TAA(图2)。获得序列已提交至GenBank(序列号: KR905383)。

序列分析显示, 黄河裸裂尻鱼肌酸激酶第20 ~ 99位的80个氨基酸为ATP-鸟苷磷酸转移酶N-端结构域, 第119 ~ 366位的248个氨基酸为ATP-鸟苷磷酸转移酶C-端催化结构域。全序列中有5个N-酰基化位点(N-myristoylation site)、1个N-糖基化位点(N-glycosylation site)、5个酪蛋白激酶II磷酸化位点(casein kinase II phosphorylation site)、6个蛋白激酶C磷酸化位点(protein kinase C phosphorylation site)(图2)。

## 2.2 黄河裸裂尻鱼肌酸激酶氨基酸序列同源性分析

应用DNAMAN Version 6.0软件, 比较黄河裸裂尻鱼肌酸激酶与鲤、斑马鱼、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、非鲫(*Oreochromis mossambicus*)、真鲷(*Pagrus major*)、牙鲆、广盐性比目鱼(*Platichthys flesus*)、孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)、大西洋鲑、鳟、墨西哥脂鲤(*Astyanax mexicanus*)、白斑狗鱼(*Esox lucius*)、剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*)、牛(*Bos taurus*)、原鸡(*Gallus gallus*)、人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、兔(*Oryctolagus cuniculus*)和大鼠(*Rattus norvegicus*)的肌型肌酸激酶(M-CK)、脑型肌酸激酶(B-CK)和线粒体肌

酸激酶(mt-CK)同源性。结果显示, 黄河裸裂尻鱼肌酸激酶与其他脊椎动物的肌型肌酸激酶(M-CK)序列同源性为73.87% ~ 94.75%; 与其他脊椎动物的脑型肌酸激酶(B-CK)同源性为66.75% ~ 79.53%; 而与其他脊椎动物的线粒体肌酸激酶(mt-CK)同源性为54.60% ~ 55.82%(表2)。

## 2.3 系统发育分析

基于肌型、脑型和线粒体型肌酸激酶氨基酸序列构建了黄河裸裂尻鱼和其他脊椎动物的系统发育树(图3)。所有脊椎动物肌酸激酶在系统发育树上形成3个族群, 分别为线粒体肌酸激酶(mt-CK)族群、脑型肌酸激酶(B-CK)族群和肌型肌酸激酶(M-CK)族群。在肌型肌酸激酶(M-CK)族群中, 黄河裸裂尻鱼肌酸激酶与斑马鱼和鲤的肌型肌酸激酶(M3-CK)聚在一支。

## 2.4 黄河裸裂尻鱼肌酸激酶基因的组织表达特征

RT-PCR结果初步显示, 在黄河裸裂尻鱼眼、心、肠、肌肉中具有较强的条带, 而在脑和肝胰脏中只有微弱条带出现, 表明可能在以上及各组织中均有肌酸激酶转录本的表达(图4a)。

Real-time PCR检测结果表明, 肌酸激酶转录本在肌肉、肠、眼、心、肝胰脏和脑中均有表达, 其中肌肉中表达量最高, 脑中只有微量表达, 而在肾和鳃组织中均未检测到肌酸激酶转录本的表达(图4b)。当以肌肉中的表达量作为参照时, 肠、眼、心、肝胰脏和脑组织中的表达量分别是肌肉表达量0.72、0.66、0.43、0.08和0.02倍。RT-PCR和Real-time PCR结果基本相一致。

## 3 讨论

本研究获得了黄河裸裂尻鱼肌酸激酶cDNA全长序列。氨基酸序列分析表明, 黄河裸裂尻鱼肌酸激酶具有典型的脊椎动物肌酸激酶结构域, 即N-端结构域和C-端催化结构域。

ACATGGGGGGCAACCC

CTACATTGGCTTGTAACAGGATCTGATCCCAAGGACTGTTACCTTTTCTCCATACAGATCACCGGAAGAGTGCAATC [142]  
**ATG ACT AAG AAC TGC AAC AAC GAT TAC AAG ATG AAG TTC GCT GTG GAG GAG GAG TTC CCT** [202]  
 Met Thr Lys Asn Cys Asn Asn Asp Tyr Lys Met Lys Phe Ala Val Glu Glu Glu Phe Pro [20]  
**GAC CTC TCC CAG CAC AAC AAC CAC ATG GCC AAG GTT CTG ACT AAG GAC ATC TAC AAC AAA** [262]  
 Asp Leu Ser Gln His Asn Asn His Met Ala Lys Val Leu Thr Lys Asp Ile Tyr Asn Lys [40]  
**CTG AGG AGC AAG TCA ACC CCC AGT GGA TTC ACC CTG GAT GAC TGC ATC CAG ACC GGT GTG** [322]  
 Leu Arg Ser Lys Ser Thr Pro Ser Gly Phe **Thr Leu Asp Asp** Cys Ile Gln **Thr Gly Val** [60]  
 CK-2 (51-54) CK-2 (58-61)  
**GAC AAC CCT GGC CAT CCC TTC ATC ATG ACC GTT GGC TGT GTG GCT GGT GAT GAG GAG TCC** [382]  
**Asp** Asn Pro Gly His Pro Phe Ile Met Thr Val Gly Cys Val Ala Gly Asp Glu Glu Ser [80]  
 N-myristoylation (72-77)  
**TAC GAA GTC TTC AAG GAG ATG TTC GAC CCC ATC ATT TCT GAC CGT CAC AGT GGC TAC AAG** [442]  
 Tyr Glu Val Phe Lys Glu Met Phe Asp Pro Ile Ile **Ser Asp Arg** His Ser Gly Tyr Lys [100]  
 PKC (93-95)  
**CCC ACC GAC AAG CAC AAG ACT GAT CTG AAC TTT GAG AAC CTG AAG GGT GGT GAT GAC CTT** [502]  
 Pro **Thr Asp Lys** His Lys Thr Asp Leu Asn Phe Glu Asn Leu Lys Gly Gly Asp Asp Leu [120]  
 PKC (102-104)  
**GAC CCC AAC TAC GTT CTT AGT AGC CGT GTG CGT ACC GGC CGT AGC ATC AAG GGA ATC ACC** [562]  
 Asp Pro Asn Tyr Val Leu **Ser Ser Arg** Val Arg **Thr Gly Arg Ser** Ile Lys Gly Ile Thr [140]  
 PKC (127-129) PKC (132-134) PKC (135-137)  
**CTG CCT CCC ACC AAC AGC CGT GGT GAG CGT AGA CTT GTG GAG AAG CTG TCC ATT GAG GCT** [622]  
 Leu Pro Pro Thr Asn **Ser Arg Gly Glu** Arg Arg Leu Val Glu Lys Leu Ser Ile Glu Ala [160]  
 CK-2 (146-149)  
**CTA AAC AGC CTG GAT GGC GAG TTC AAG GGC AAG TAC TAC CCT CTG AAG GAC ATG AGT GAT** [682]  
 Leu Asn Ser Leu Asp Gly Glu Phe Lys Gly Lys Tyr Tyr Pro Leu Lys Asp Met **Ser Asp** [180]  
 PKC (179-181)  
**AAG GAA CAG GAG CAG CTC ATT GCT GAC CAC TTC CTG TTT GAC AAG CCT GTG TCC CCC CTG** [742]  
**Lys Glu** Gln Glu Gln Leu Ile Ala Asp His Phe Leu Phe Asp Lys Pro Val Ser Pro Leu [200]  
 CK-2 (179-182)  
**CTG TTG TCT GCT GGC ATG GCT CGC GAT TGG CCT GAT GCA AGA GGC ATC TGG CAC AAT GTC** [802]  
 Leu Leu Ser Ala Gly Met Ala Arg Asp Trp Pro Asp Ala Arg Gly Ile Trp His Asn Val [220]  
 N-myristoylation (215-220)  
**AAC AAG ACC TTC TTG GTG TGG GTG AAC GAG GAG GAT CAC CTG CAT GTC ATC TCC ATG CAG** [862]  
**Asn Lys Thr Phe** Leu Val Trp Val Asn Glu Glu Asp His Leu His Val Ile Ser Met Gln [240]  
 N-glycosylation (221-224)  
**CAG GGT GGC AAC ATG AAG GAG GTC TTC AAG AGG TTC TGC GTT GGC CTG CAG AAG ATT GAG** [922]  
 Gln Gly Gly Asn Met Lys Glu Val Phe Lys Arg Phe Cys Val Gly Leu Gln Lys Ile Glu [260]  
**GAA GTC TTC AAG AAG CAC AAC CAC GGT TTC ATG TGG AAC GAG CAT CTT GGT TTC GTC CTG** [982]  
 Glu Val Phe Lys Lys His Asn His Gly Phe Met Trp Asn Glu His Leu Gly Phe Val Leu [280]  
**ACC TGC CCC TCT AAC TTG GGT ACC GGC CTG CGT GGT GGT GTC CAC GTC AAG CTG CCC AAA** [1042]  
 Thr Cys Pro Ser Asn Leu Gly Thr **Gly Leu Arg Gly Gly Val** His Val Lys Leu Pro Lys [300]  
 N-myristoylation (289-294)  
**CTC AGC ACA CAT GCC AAA TTT GAG GAG ATC CTG ACC AGA CTG CGT CTT CAG AAG CGT GGC** [1102]  
 Leu Ser Thr His Ala Lys Phe Glu Glu Ile Leu Thr Arg Leu Arg Leu Gln Lys Arg Gly [320]  
**ACA GGT GGC GTG GAC ACT GCC TCT GTT GGT GGG GTG TTC GAC ATC TCC AAC GCT GAC CGT** [1162]  
 Thr **Gly Gly Val Asp Thr Ala** Ser Val Gly Gly Val Phe Asp Ile **Ser Asn Ala Asp** Arg [340]  
 N-myristoylation (322-327) CK-2 (336-339)  
**CTG GGC TCC TCC GAG GTG CAG CAG GTG CAG CTC GTG GTC GAT GGT GTG AAG CTC ATG GTT** [1222]  
 Leu Gly Ser Ser Glu Val Gln Gln Val Gln Leu Val Val Asp Gly Val Lys Leu Met Val [360]  
**GAA ATG GAA AAG AAA CTG GAG AAG GGC GAG TCC ATC GAT GGC ATG ATC CCT GCC CAG AAG** [1282]  
 Glu Met Glu Lys Lys Leu Glu Lys Gly Glu Ser Ile Asp **Gly Met Ile Pro Ala Gln** Lys [380]  
 N-myristoylation (374-379)  
**TAA** [1285]  
 \*  
 AATGGCAAAGTGCTTTTCTTTTATTTTGTCTTTCAAGCAGTCATGCCATCTTGACTTTTCCAAGAGACACTCCAC [1364]  
 CCTGCTCCCTTTTCAAATTTATCTCTTCTTTCTTCTCTGTGTCTATTTTCTGCACTTTTCTCTTATCT [1443]  
 TCCTGTTCTCTGTAACATCTGGGATCAAACCTCCACATAGCTAGAAAACCTAGCTATGTTGTATTACCACTAACT [1522]  
 TTATTTTTTGGTGTACAAAGTTAATAAACGGCCCATGTAACAAATCGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA [1599]

图2 黄河裸裂尻鱼肌酸激酶基因全长cDNA序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 The full-length cDNA sequences of creatine kinase gene and the deduced amino acids sequence from *Schizopygopsis pylzovi* (转下页)

(接上页) 下划线表示起始密码子 ATG; \* 表示非编码氨基酸的终止密码子; 粗体字表示完整的开放阅读框。黑色框表示酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点 (CK-2); 灰色框表示 N-糖基化位点; 黑色虚线框表示蛋白激酶 C 磷酸化作用位点 (PKC); 灰色阴影表示 N-酰基化位点。

Starting codon ATG are underlined. The asterisk in amino acid sequence indicates the non-encoding termination codon. Boldface characters represent open reading frame (ORF). Casein kinase II phosphorylation sites (CK-2) are in black boxes; N-glycosylation sites are in gray boxes; Protein kinase C phosphorylation sites (PKC) are in black dotted boxes; N-myristoylation sites are shadowed in gray.

表2 黄河裸裂尻鱼与其他脊椎动物肌酸激酶氨基酸序列比较

Table 2 Amino acid sequence homologies of creatine kinase between Huanghe schizothoracin and other vertebrates

物种 Species	肌酸激酶类型 Creatine kinase type	氨基酸长度 Length of amino acids	登录号 GenBank accession No.	一致性 (%) Identity
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	M1-CK	381	AF055288	86.88
	M2-CK	381	AF055289	86.88
	M3-CK	380	AF055290	94.49
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	M3-CK	380	AY260853	94.75
	M-CK	381	BC056706	87.93
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	M-CK	381	NM_001245943	86.61
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	M-CK	381	HG315740	87.66
非鲫 <i>Oreochromis mossambicus</i>	M2-CK	380	AY034098	88.98
真鲷 <i>Pagrus major</i>	M1-CK	381	GU135652	86.61
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	M-CK	381	EU024928	86.88
广盐比目鱼 <i>Platichthys flesus</i>	M-CK	381	FN432387	86.09
孔雀鱼 <i>Poecilia reticulata</i>	M1-CK	381	EF408826	86.09
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	M3-CK	381	BT043801	87.14
	M2-CK	381	NM_001139716	87.66
鳊 <i>Siniperca chuatsi</i>	M-CK	381	FJ613633	88.45
墨西哥脂鲤 <i>Astyanax mexicanus</i>	M-CK	381	XM_007260973	88.71
牛 <i>Bos taurus</i>	M-CK	381	BT021173	75.53
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	M-CK	381	NM_205507	73.87
人 <i>Homo sapiens</i>	M-CK	381	NM_001824	76.25
小鼠 <i>Mus musculus</i>	M-CK	381	NM_007710	76.25
兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	M-CK	381	NM_001082239	76.01
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	M-CK	381	NM_012530	76.01
	B-CKa	381	NM_001077163	77.43
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	B-CKb	381	BC064285	77.69
白斑狗鱼 <i>Esox lucius</i>	B-CK	381	NM_001304218	79.00
斑点叉尾鲷 <i>I. punctatus</i>	B-CK	381	NM_001200451	79.53
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	B-CK	381	NM_001160490	75.07
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	B-CK	381	NM_001139778	74.80
墨西哥脂鲤 <i>A. mexicanus</i>	B-CK	381	XM_007230924	76.12
牛 <i>B. taurus</i>	B-CK	381	BT020708	67.93
原鸡 <i>G. gallus</i>	B-CK	381	NM_205310	69.36
人 <i>H. sapiens</i>	B-CK	381	NM_001823	67.93
小鼠 <i>M. musculus</i>	B-CK	381	NM_021273	66.75
兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	B-CK	381	NM_001082261	68.17
大鼠 <i>R. norvegicus</i>	B-CK	381	NM_012529	66.98
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	mt-CK	417	BC048050	54.92
白斑狗鱼 <i>E. lucius</i>	mt-CK	414	XM_010901369	54.90
剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	mt-CK	415	XM_005807450	54.80
牛 <i>B. taurus</i>	mt1B-CK	416	NM_174275	54.63
原鸡 <i>G. gallus</i>	mt1A-CK	417	NM_204182	55.82
	mt1A -CK	417	NM_001015001	54.63
人 <i>H. sapiens</i>	mt1B -CK	417	NM_020990	54.63
	mt1-CK	418	NM_009897	54.60
小鼠 <i>M. musculus</i>	mt1-CK	418	NM_001012738	55.11
大鼠 <i>R. norvegicus</i>	mt1B-CK	418	NM_001034656	55.11
牛 <i>B. taurus</i>	mt2-CK	419	NM_198415	55.34
小鼠 <i>M. musculus</i>	mt2-CK	419	NM_001127652	55.34
大鼠 <i>R. norvegicus</i>	mt2-CK	419		

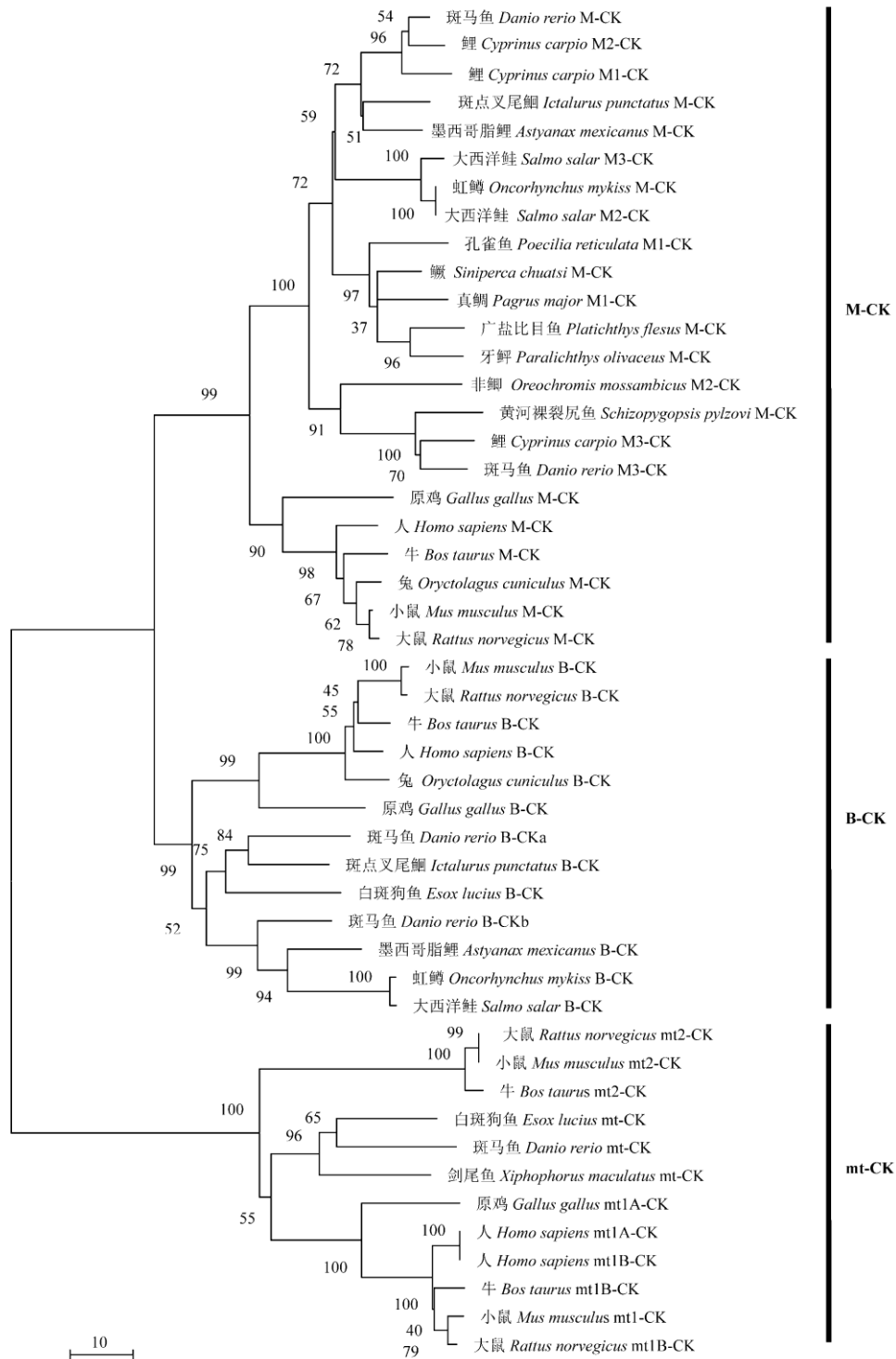


图3 基于肌酸激酶基因氨基酸序列构建的黄河裸裂尻鱼及其他脊椎动物系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Schizopygopsis pylzovi* and other vertebrates based on creatine kinase amino acid sequences (转下页)



(接上页) 节点上数据表示 1 000 次重复的支持率; 比例尺表示每千碱基的替换数目; M-CK, B-CK 和 mt-CK 分别指肌型、脑型和线粒体型肌酸激酶。

Numbers at the nodes denote the bootstrap values of 1 000 replicates; Scale represents the numbers of substitutions per 1 000 bases; M-CK, B-CK and mt-CK refer to muscle-type, brain-type and mitochondrion-type creatine kinase, respectively.

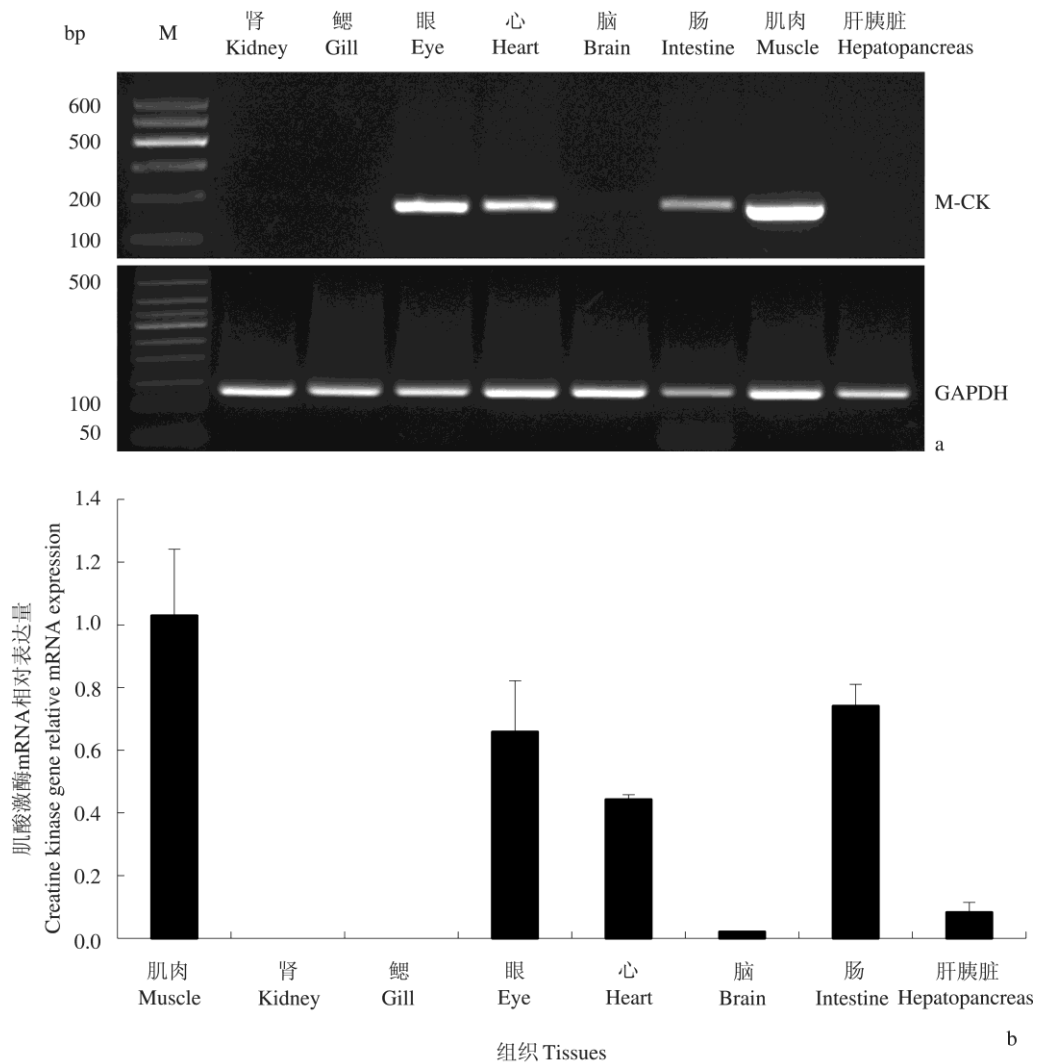


图4 黄河裸裂尻鱼肌酸激酶基因组织表达的RT-PCR (a) 和Real-time PCR (b) 检测结果

Fig. 4 mRNA expression of creatine kinase gene in different tissues of *Schizopygopsis pylzovi* as revealed by using RT-PCR (a) and Real-time PCR (b) methods

a. 肌酸激酶基因组织表达的RT-PCR结果; b. 肌酸激酶基因组织表达的Real-time PCR结果。

a. mRNA expression detections of creatine kinase gene using RT-PCR; b. mRNA expression detections of creatine kinase gene using Real-time PCR.

氨基酸序列同源性分析显示, 黄河裸裂尻鱼肌酸激酶 (CK) 与其他鱼类的肌型肌酸激酶

(M-CK) 序列同源性最高 (86.09% ~ 94.75%)。与鲤 (Sun et al. 2002) 和斑马鱼 (Harder et al.

2001)的肌型肌酸激酶(M3-CK)相比,三者均编码380个氨基酸,同源性高达95.0%左右;而与其他鱼类的脑型肌酸激酶(B-CK)、线粒体型肌酸激酶(mt-CK)同源性较低。由肌酸激酶(CK)的氨基酸序列系统发育分析显示,黄河裸裂尻鱼肌型肌酸激酶(M-CK)与其他鱼类的肌型肌酸激酶(M-CK)形成一个族群,而且与斑马鱼和鲤的肌型肌酸激酶(M3-CK)形成一个单系群。由此可以初步判定本研究克隆获得的黄河裸裂尻鱼肌型肌酸激酶基因可能是鲤和斑马鱼肌型肌酸激酶(M3-CK)的直系同源基因。前期研究在鲤中克隆获得3种不同的肌型肌酸激酶旁系同源基因,即M1-CK、M2-CK和M3-CK,其中前两种编码381个氨基酸,而肌型肌酸激酶M3-CK编码380个氨基酸(Sun et al. 2002)。虽然黄河裸裂尻鱼属鲤科鱼类,并且与斑马鱼和鲤存在着较近的亲缘关系,但是黄河裸裂尻鱼是否同样存在3种肌型酸激酶旁系同源基因?有待于进一步研究证实。

肌型肌酸激酶(M-CK)在动物心肌的能量代谢中发挥重要作用。研究表明,降低肌型肌酸激酶(M-CK)的表达量或改变肌型肌酸激酶(M-CK)同工酶的分布,将引起大鼠左心室肥大,甚至造成心衰竭(Hammerschmidt et al. 2000),其主要原因可能是改变了心肌磷酸激酶(cardiac muscle phosphokinase, PCr)与三磷酸腺苷(ATP)的平衡。本研究中,黄河裸裂尻鱼肌酸激酶转录本在心肌具有较强的表达,说明肌酸激酶作为心肌PCr/ATP平衡的主要调控者,在心的能量代谢和功能发挥中起着重要作用。

肌型肌酸激酶(M-CK)的另一重要生物学功能就是与动物骨骼肌的形成和生长有关。研究发现,肌型肌酸激酶(M-CK)作为细胞分化因子(myogenic differentiation, MyoD)和特异性肌细胞增强子结合因子2(myocyte enhancer-binding factor 2, MEF2)的下游靶基因,启动与肌细胞分化和肌肉生长有关的基因

的表达(Olson et al. 1995)。细胞分化因子(Myod)是一特异性的DNA结合蛋白,可结合在肌型肌酸激酶(M-CK)上游特定DNA序列位点,而MEF2结合在肌型肌酸激酶(M-CK)基因增强子A/T,两种因子共同作用后,发挥肌型肌酸激酶(M-CK)对肌肉分化和生长相关的生物学功能。此外,肌型肌酸激酶(M-CK)可直接结合在肌原纤维上为肌肉的收缩提供能量。因此,黄河裸裂尻鱼肌酸激酶转录本在肌肉和肠中的强表达可能与其生物学功能相适应。

黄河裸裂尻鱼肌酸激酶转录本在肝胰脏和脑中表达微弱,可能与该组织能量代谢水平相关,或者与其他类型同工酶参与作用相关,前期研究已证实在神经组织(脑)中通常以脑型肌酸激酶为主(Mühlebach et al. 1994)。然而,本研究中有一个新发现,就是黄河裸裂尻鱼肌酸激酶转录本在眼组织中具有强表达,这与以往研究截然不同。黄河裸裂尻鱼肌酸激酶转录本在眼组织中的特殊表达模式是否与肌酸激酶的其他功能有关?有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- Abraham M R, Selivanov V A, Hodgson D M, et al. 2002. Coupling of cell energetics with membrane metabolic sensing: integrative signaling through creatine kinase phosphotransfer disrupted by M-CK gene knock-out. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27): 24427-24434.
- Andreassen R, Lunner S, Høyheim B. 2009. Characterization of full-length sequenced cDNA inserts (FLICs) from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, 10: 502, doi: 10.1186/1471-2164-10-502.
- Batista e Silva C M, Tavares N N, Giovanni-De-Simone S, et al. 2000. Purification and partial characterization of creatine kinase from electric organ of *Electrophorus electricus* (L). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32(4): 427-433.
- Burland T G. 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods in Molecular Biology*, 132(1): 71-91.
- Chen Y J, Zhang Q Q, Qi J, et al. 2010. Cloning and stage-specific

- expression of *CK-M1* gene during metamorphosis of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 28(3): 558–564.
- Gray K A, Grossman S H, Summers D D. 1986. Purification and characterization of creatine kinase isozymes from the nurse shark *Ginglymostoma cirratum*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 83(3): 613–620.
- Hammerschmidt S, Bell M, Böhler N, et al. 2000. Acute changes of myocardial creatine kinase gene expression under  $\beta$ -adrenergic stimulation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Molecular Basis of Disease, 1502(3): 471–480.
- Harder G, McGowan R. 2001. Isolation and characterization of the muscle-specific isoform of creatine kinase from the zebrafish, *Danio rerio*. Biochemistry and Cell Biology, 79(6): 779–782.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, 5(2): 150–163.
- Liu Z J, Kim S, Kucuktas H, et al. 2001. Multiple isoforms and an unusual cathodic isoform of creatine kinase from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Gene, 275(2): 207–215.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Methods, 25(4): 402–408.
- Mithlebach S M, Gross M, Wirz T, et al. 1994. IV-2 Sequence homology and structure predictions of the creatine kinase isoenzymes. Molecular and Cellular Biochemistry, 133/134(1): 245–262.
- Olson E N, Perry M, Schulz R A. 1995. Regulation of Muscle Differentiation by the MEF2 Family of MADS Box Transcription Factors. Developmental Biology, 172(1): 2–14.
- Petrova T A, Shamova O V, Lyzlova S N. 1988. Comparative enzymologic analysis of creatine kinases from the skeletal muscles of the cod, frog and rabbit. Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimiii Fiziologii, 24(4): 489–496.
- Qi D L, Guo S C, Zhao X Q, et al. 2007. Genetic diversity and historical population structure of *Schizopygopsis pylzovi* (Teleostei: Cyprinidae) in the Qinghai-Tibetan Plateau. Freshwater Biology, 52(6): 1090–1104.
- Ríos R, Carneiro I, Arce V M, et al. 2002. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. American Journal of Physiology: Cell Physiology, 282(5): C993–C999.
- Spindler M, Niebler R, Remkes H, et al. 2002. Mitochondrial creatine kinase is critically necessary for normal myocardial high-energy phosphate metabolism. American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology, 283(2): H680–H687.
- Sun H W, Liu C W, Hui C F, et al. 2002. The carp muscle-specific sub-isoenzymes of creatine kinase form distinct dimers under at different temperatures. Biochemical Journal, 368(3): 799–808.
- Weintraub H, Davis R, Tapscott S, et al. 1991. The MyoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. Science, 251(4995): 761–766.
- West B L, Babbitt P C, Mendez B, et al. 1984. Creatine kinase protein sequence encoded by a cDNA made from *Torpedo californica* electric organ mRNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81(22): 7007–7011.
- 晁燕, 祁得林, 申志新, 等. 2011. 黄河裸裂尻鱼细胞色素 C 氧化酶 I、II 和 III 亚基基因的克隆及序列特征分析. 动物学杂志, 46(4): 16–24.
- 晁燕, 赵兰英, 李长忠, 等. 2012. 黄河裸裂尻鱼肌肉生长抑制素基因克隆及表达分析. 动物学研究, 33(5): 473–480.
- 石耀华, 刘军, 夏建红, 等. 2003. 银鲫肌酸激酶 M3-CK cDNA 的克隆及其表达特征. 动物学报, 49(5): 637–645.
- 武云飞, 吴翠珍. 1992. 青藏高原鱼类. 成都: 四川科学技术出版社.
- 张敏, 赵金良, 邓燕飞. 2010. 鳊肌酸激酶 M-CK cDNA 的克隆与组织表达分析. 动物学研究, 31(1): 77–83.
- 赵兰英, 晁燕, 李长忠, 等. 2012. 黄河裸裂尻鱼肥胖基因克隆及其对青藏高原季节性冷环境的适应性表达. 中国实验动物学报, 20(6): 31–37.