

# 黄条鲷(*Seriola aureovittata*)*MyHC* 基因克隆 及其在早期发育阶段表达研究\*

史宝<sup>1</sup> 孙冉冉<sup>1,2</sup> 柳学周<sup>1,2</sup> 徐永江<sup>1</sup> 姜燕<sup>1</sup> 王滨<sup>1</sup> 张正荣<sup>1</sup>

(1. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023)

**摘要** 为解析肌球蛋白重链(*MyHC*)基因在黄条鲷(*Seriola aureovittata*)生长发育过程中作用机制,本研究采用 RACE 技术,克隆了黄条鲷 *MyHC* 基因全长 cDNA 序列,采用荧光定量 PCR(qRT-PCR)方法对 *MyHC* 在黄条鲷不同组织、胚胎发育过程以及仔稚幼鱼发育过程中的表达特征进行了研究。结果表明:黄条鲷 *MyHC* 基因全长为 6143bp,开放阅读框为 5811bp,编码了 1936 个氨基酸,由 3 个保守结构域组成即 MYSc-class II、Myosin tail1 和 SH3;系统进化树分析显示黄条鲷 *MyHC* 与高体鲷进化关系最近。qRT-PCR 分析发现黄条鲷 *MyHC* 在各组织中均有表达,但在肌肉中表达量最高( $P<0.05$ );随着黄条鲷胚胎发育的进行,*MyHC* 在 16 细胞期之前表达量较高,在胚体下包 2/3 时期表达量显著升高,且在孵化期达到峰值( $P<0.05$ );在仔稚幼鱼发育阶段,*MyHC* 在孵化后 20d 后表达量显著升高,30d 表达水平达到峰值( $P<0.05$ ),随后的 35d 到 40d 表达水平略有下降但仍保持较高表达趋势,黄条鲷 *MyHC* 表达具有发育阶段表达的特异性。*MyHC* 表达特征揭示其参与了调控黄条鲷的早期生长发育。

**关键词** 黄条鲷; *MyHC*; 胚胎发育; 仔稚幼鱼发育; 基因克隆; 表达分析

中图分类号 S917.4 doi: 10.11693/hyhz20191100205

肌纤维体积决定了肌肉的生长发育,骨骼肌纤维粗肌丝的基本组成单位是肌球蛋白。肌球蛋白是动物体内一种重要的功能性马达蛋白,在肌肉运动、细胞器运动以及肌肉收缩和信号传导等方面发挥着重要调控作用(Heissler *et al.*, 2016)。肌球蛋白是由 2 条肌球蛋白重链(*MyHC*)和 4 条肌球蛋白轻链(*MyLC*)组成。*MyHC* 具有 ATP 酶活性,可将其水解为 ADP 释放能量,并且含有肌动蛋白结合位点,为肌肉收缩提供动力从而直接影响鱼类的生长(Knight *et al.*, 2000; Champion *et al.*, 2012)。与哺乳动物肌肉生长的模式不同,鱼类肌纤维生长模式始终存在增生和增粗,鱼类

这种生长现象被称为非限制性生长。研究表明 *MyHC* 表达量高低影响肌纤维的增生,与鱼类的非限制性生长有关(Biga *et al.*, 2009; 陈之航等, 2017)。在翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*), *MyHC* 在快长组与慢长组实验鱼中的差异表达提示其在翘嘴鲌胚胎及早期生长发育过程中发挥重要作用(陈之航等, 2017)。对大西洋鲑(*Salmo salar*)的研究表明鱼体特定生长率与 *MyHC* 表达量的高低有关(Hevrøy *et al.*, 2006)。对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)的研究发现 *MyHC* 在仔虾第一天的表达量显著高于胚胎发育的其他时期(王佳佳等, 2019)。

\* 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室开放课题, 2017-3A01 号; 国家重点研发计划项目, 2018YFD0901204 号, 2019YFD0900503 号; 国家自然科学基金项目, 31772829 号; 中国水产科学研究院院级基本科研业务费-农业部海洋渔业可持续发展重点实验室开放课题资助, 2019HY-XKQ01 号; 国家海水鱼产业技术体系项目, CARS-47 号。史宝, 博士, 副研究员, E-mail: shibao@ysfri.ac.cn

通信作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-11-06, 收修改稿日期: 2020-01-06

黄条鲮 (*Seriola aureovittata*) 属鲈形目 (Perciformes)、鲈科 (Carangidae)、鲮属 (*Seriola*), 是我国本土分布的大洋性经济鱼类(柳学周等, 2017; 史宝等, 2019a, b), 具有营养丰富、生长速度快等优点。生长速度是鱼类养殖中一项重要的经济指标, 而提高鱼类产量是水产养殖业不断追求的目标, 因此解析鱼类肌肉生长发育基因的分子调控机制有利于鱼类养殖业发展。黄条鲮早期生长发育研究相对较少, 相关功能基因研究信息缺乏。本研究克隆了黄条鲮 *MyHC* 基因全长 cDNA 序列、分析了其序列结构与分子系统进化, 并利用实时荧光定量 PCR 方法进一步研究了 *MyHC* 在不同组织、胚胎发育进程、仔稚幼鱼发育阶段的表达图式, 为揭示 *MyHC* 在黄条鲮早期发育和后期生长中的生理功能奠定基础, 以期为黄条鲮的养殖产业可持续发展提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及取样

本研究所用黄条鲮采集自大连富谷水产有限公司。实验鱼养殖过程中的培育条件: 养殖期间海水盐度为 28—30、水温为 18—25°C、pH 为 8.0—8.3; 投喂鲜杂鱼饵料, 日投喂 2 次(8:00, 15:00), 投喂量为鱼体质量的 2%—5%。挑选 3 尾体质健康的一龄黄条鲮, 全长 33—35cm, 体重 450—500g。实验鱼经 MS222 麻醉后快速解剖, 取脑、垂体、鳃、肝脏、肌肉、头肾、脾脏、肾脏、心脏、胃、肠, 液氮中速冻, 置于 -80°C 保存。

在黄条鲮繁殖季节首先在 NIKON 解剖镜 (MSZ800, 日本) 下观察胚胎发育情况, 依据黄条鲮胚胎时期发育阶段的划分(徐永江等, 2019), 从受精卵到初孵仔鱼共 18 个时间点取材, 每个时间点平行取 3 个样本。孵化后的仔稚幼鱼(1—60 日龄)共 14 个时间点取材, 每个时间点平行取 3 个样本。迅速冻于液氮, 用于胚胎和仔稚幼鱼发育过程的基因表达分析。

### 1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成

黄条鲮肌肉组织中总 RNA 的提取按照 RNAiso Plus (TaKaRa, 日本) 试剂说明书进行, 然后通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 28S 和 18S 二条带清晰可见; 使用 Nanodrop2000 (Thermo, 美国) 测定 RNA 浓度。cDNA 第一链合成使用 PrimeScript RT reagent Kit 反转录试剂盒(TaKaRa, 日本), 以肌肉总 RNA 为模板; 合成的 cDNA 第一链用于核心片段扩增。5'RACE 和 3'RACE cDNA 第一链合成参照 SMARTer™ RACE

cDNA Amplification Kit (Clontech, 美国) 试剂盒操作说明进行。

### 1.3 *MyHC* 基因 cDNA 的 RACE 克隆

采用 Primer Premier 5.0 软件设计特异扩增引物(表 1)。以黄条鲮肌肉 cDNA 为模板, 扩增核心片段。PCR 反应体系为 25μL: 10×PCR Buffer 2μL, Taq 酶 0.5μL, dNTP Mixture 2.5μL, 正、反向引物各 2μL, cDNA 2μL, ddH<sub>2</sub>O 14μL。PCR 反应条件为 94°C 5min、95°C 30s、59°C 30s、72°C 40s, 36 个循环, 72°C 延伸 10min, PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳后, 用 E.Z.N.A.™ Gel Extraction Kit Manual 胶回收试剂盒(Omega, 美国)回收纯化, 然后克隆至 pEASY-T1 载体, 转入 Transl-T1 感受态细胞(全式金, 中国), PCR 检测阳性克隆后送上海生工生物工程股份有限公司进行测序。

根据克隆得到的 *MyHC* 核心片段序列及 RACE 试剂盒要求设计 RACE 特异引物(表 1)。5'RACE 反应的操作参照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒方法进行。5'RACE 的首次 PCR 反应体系为 25μL: 10×Advantage 2 PCR Buffer 2.5μL, 50×dNTP Mix 2μL, 50×Advantage 2 Polymerase Mix 0.5μL, 5'RACE 模板 cDNA 1μL, 正向引物 UPM 1μL、反向引物 *MyHC*-5'-R1 0.5μL, PCR-Grade Water 17.5μL。PCR 反应条件为 94°C 30s, 65°C 30s, 72°C 3min, 共 25 个循环。取首次 PCR 产物, 加入 Tricine-EDTA buffer 进行 10 倍稀释后作为巢式 PCR 的模板, NUP 为正向引物、*MyHC*-5'-R2 为内侧反向引物, 进行目标基因的 5'RACE 第二次扩增, PCR 反应条件同上。3'RACE 的操作参照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒方法进行, 3'RACE 的 PCR 反应体系及反应条件与 5'RACE 相似。RACE 产物纯化、克隆和测序方法同上。

### 1.4 反转录实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

利用荧光定量 PCR 检测 *MyHC* 基因的表达水平。根据克隆获得的黄条鲮 *MyHC* cDNA 全长序列和内参基因 18S, 采用 Primer Premier 5.0 设计荧光定量 PCR 引物(表 1)。参照 SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa, 日本) 荧光定量预混试剂盒说明书进行操作, 每个样品设定 3 个重复, 20μL 反应体系: SYBR Premix Ex Taq™ 10μL, 正、反向引物(10μmol/L)各 0.8μL, cDNA 2μL, RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 补足到 20μL。反应条件为 95°C 预变性 30s; 95°C 循环变性 5s, 60°C 退火复性 20s, 72°C 延伸 30s, 共 40 个循环。内参基因 18S 的实时 PCR 检测也被平行执行。PCR 反应结束后使

用 Mastercycler ep *realplex* 荧光实时定量 PCR 仪自带软件包进行扩增和熔解曲线分析。结果采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法对不同基因的表达量进行比较分析(Livak *et al*, 2001)。

表 1 黄条鲮基因克隆、定量分析使用的引物序列

Tab.1 Sequence of specific primers used for cloning and quantitative real-time PCR analyses in *S. aureovittata*

| 引物名称                 | 引物序列(5'→3')          | 用途              |
|----------------------|----------------------|-----------------|
| MyHC-F1              | TCACTGTAAAAGACGACGCA | 中间片段 PCR 克隆 1 段 |
| MyHC-R1              | TTCACTCTGGGGTAGCATAA |                 |
| MyHC-F2              | GGTCGGGAACGAGTATGT   | 中间片段 PCR 克隆 2 段 |
| MyHC-R2              | ACCTTTGCCAGGGTGAG    |                 |
| MyHC-F3              | TGTTCACTCAGCCCGTCAT  | 中间片段 PCR 克隆 3 段 |
| MyHC-R3              | TCACGACTCTTCGCCCTC   |                 |
| MyHC-5'-R1           | CTGAAGCCACTGCGATTGT  | 5'RACE, 1st PCR |
| MyHC-5'-R2           | TGGGGAAGATTGCGTCGTC  | 5'RACE, 2nd PCR |
| MyHC-3'-F1           | GACACCAGCGGTCATTTG   | 3'RACE, 1st PCR |
| MyHC-3'-F2           | CTGAGTCCCAGGTCAACAAG | 3'RACE, 2nd PCR |
| <i>MyHC</i> -qPCR-F1 | TCACTGTAAAAGACGACGCA |                 |
| <i>MyHC</i> -qPCR-R1 | CACTGGGAGCCACTTGTAGG |                 |
| 18S-F                | TACCACATCCAAAGAAGGCA |                 |
| 18S-R                | TCGATCCCAGATCCAACCTA |                 |

## 1.5 序列结构及系统进化分析

黄条鲮 MyHC 蛋白的结构、分子量和等电点的预测, 使用 ExPasy 在线软件预测 ([www.expasy.org/tools/protparam.html](http://www.expasy.org/tools/protparam.html)); 应用软件 DNAMAN 6.0 软件进行序列拼接、氨基酸序列推导和不同物种的 MyHC 氨基酸同源性分析; 通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLAST 进行 DNA 和蛋白质序列相似性搜索; 使用 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行结构域的预测; 通过 SOPM (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa-automat.pl/page=npsa-sopma.html>) 分析蛋白质二级结构; 应用 ClustalW 在线软件 (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) 进行氨基酸序列比对; 采用 MEGA 6.0 软件构建蛋白的系统进化树, 1000 次重复计算自展 (bootstrap) 值。

## 1.6 数据处理

实验数据用平均值±标准差表示, 并用 Origin 8.0 作图。统计分析采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 使用 SPSS 19.0 软件中 Duncan's Multiple Range Test 比较基因相对表达水平的差异, 以  $P < 0.05$  作为显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 *MyHC* 基因序列与结构特征

扩增产物经纯化、克隆、测序、拼接后获得黄条鲮 *MyHC* 全长 6143bp 的 cDNA 序列。将序列提交 GenBank 数据库, 获得登录号为 MH378805。该 cDNA 序列包括 135bp 5'UTR、5811bp 的 ORF 和 197bp 的 3'UTR, 编码 1936 个氨基酸, 蛋白预测的分子量 222.07kDa, 等电点 5.6; *MyHC* 氨基酸序列有 4 个 ATP 结合位点, 两个保守结构域, 分别是头区 MYSc-class II (99—767) 和尾区 Myosin tail1 (847—1920) 结构域; 另外, N 端含有结构域 Src 同源区 3 (Srchromology3, SH3)(34—72aa)(图 1)。

### 2.2 *MyHC* 的氨基酸序列比对及系统进化树分析

对不同物种 *MyHC* 氨基酸序列进行多重比对分析, 结果显示黄条鲮 *MyHC* 的氨基酸序列与同属鲈形目高体鲮 (*S. dumerili*) 的同源性最高为 97.2%, 与牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 同源性为 95.1%, 与草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 同源性为 76.7%, 与小鼠 (*Mus musculus*) 的同源性为 82.8%, 与人 (*Homo sapiens*) 的同源性为 82.4%; 不同物种 *MyHC* 既有高

CTAATACGACTACTATA  
-138 TATGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGATAGGGCACCAGTCAAGATCCT  
-120 TCATTAGAACATCATAATCTGTTTTCTAGTGGGAGGAAAGTGAAGGTCATCAATA  
-60 ATGAGTGGGGACCAGAAATGGAGTGTTTGGCCCGGGCCATTACCTCCGGAGGCCA  
1 M S G D P E M E C F G P A A I Y L R K P  
1 GAAAGAGAGAGAATTGAAGCTCAAAACACTCCCTTTGATGCTAAAACGGCTACTTTGTT  
61 E R E R I E A Q N T P F D A K T A Y F V  
21 TCTGAGCCTGCTGAAATGTACCTCAAGGGGAAACTTGTGAAGAGAGAGGGCGGCAAGCC  
121 S E P A E M Y L K G K L V K R E G G K A  
41 ACCGTGGAGACTCTGTGGAAAAGATCACTGTAAAAGACGACGCAATCTTCCCCTATG  
181 T V E T L C G K S I T V K D D A I F P M  
61 AACCTCCAAAGTTCGACAAGATTGAGGACATGGCCATGATGACCACTCAGTGAAGCCG  
241 N P P K F D K I E D M A M M T H L S E P  
81 TCTGTGCTGATAACCTCAAAGAGCGCTATGCAGCATGGATGATCTACCTACTCAGGG  
301 S V L Y N L K E R Y A A W M I Y T Y S G  
101 CTGTTCTGTGTCACCGTGAACCCCTACAAGTGGCTCCAGTGTACGACTCAGTGGTGTGA  
361 L F C V T V N P Y K W L P V Y D S V V V  
421 GCAGGATACAGAGGAAAAAGAGGGTTGAGGCTCCACCCACATTTTCCATCTGTAT  
121 A G Y R G K K R V E A P P H I F S I S D  
141 AACGCCTATCAGTTCATGCTCACTGACCGTGAGAAATCAGTCAATCCTTATCACTGGAGAA  
481 N A Y Q F M L T D R E N Q S I L I T G E  
161 TCCGGTGCAGGAAAGACTGTCAACACCAACGTGTATCCAGTACTTGGCACAATCGCA  
541 S G A G K T V N T K R V I Q Y F A T I A  
181 GTGGCTCAGGAAAAAGCAACAGAGTCACTGGAAAATGCAGGGTTCGCTGGAGGAT  
601 V A S G K K A T E S A G K M Q G S L E D  
201 CAGATCATTGCAGCTAACCACTGCTGGAGGCTTATGAAAATGCCAAAATGTGAGGAA  
661 Q I I A A N P L L E A Y G N A K T V R N  
221 GACAATCATCCGCTTTGGTAAATTTATCAGATCCACTTCGGAACAACCTGGGAAGTTG  
721 D N S S R F G K F I R I H F G T T G K L  
241 GCCTCAGCAGATTGAAACATATCTGCTGGAGAAGTCTCGAGTGCAGTTCACAGTGTCT  
781 A S A D I E T Y L L E K S R V T F Q L S  
261 GCTGAGGAGTACCACATCTTATCAGCTCATGACAGGCCACAAAACCTGAGCTGATA  
841 A E R S Y H I F Y Q L M T G H K P E L I  
281 GAGGCTCTGTGATCACCACAAATCCATATGACTATCTATGATCAGTCAGGTGAAATC  
901 E A L L I T T N P Y D Y S M I S Q G E I  
301 ACTGTCAAGAGTATCAATGACATTGAAGAATTCATCGCTACTGATAGTCTATTGACATC  
961 T V K S I N D I E E F I A T D T A I D I  
321 CTGGGCTTCACTGCAGAAGAGAAGCAAGCATGTACAAGTCACTGGAGCTGTGATACAT  
1021 L G F T A E E K A S M Y K L T G A V I H  
341 CACGAAACATGAAATTCAGCAGAAAGCAGCGTGAAGAGCAGGCTGAGCTGATGGCAT  
1081 H G N M K F K Q K Q R E E Q A E P D G T  
361 GAGGTGGCAGATAAAATCGCTACCTCATGGTCTGAACCTGCTGATTGCTCAAAGCA  
1141 E V A D K I A Y L M G L N S A D L L K A  
381 TTATGCTACCCAGAGTGAAGTTCGGAAACGAGTATGTACCAAAGTCAAACCTGTCCT  
1201 L C Y P R V K V G N E Y V T K G Q T V P  
401 CAGGTCAACAATTCGGTCACTGGCTCTGCAAGTCTGCTATGAGAAAATGTTCTGTGG  
1261 Q V N N S V M A L C K S V Y E K M F L W  
421 ATGCTCGTCAGAAATCAATGAGATGCTGGATACCAGGCAGCCAAGAAGCTATTTCACTGGT  
1321 M V V R I N E M L D T R Q P R S Y F I G  
441 GTCCTGGATATTGCTGGTTTGAATCTTTGATTTCAACAGCTTGGAGCAGCTTTGTATC  
1381 V L D I A G F E I F D F N S L E Q L C I  
461 AACTTCAACAATGAAAACGCAACAGTTTTCAACCACCATGTTTGTCTGGAGCAA  
1441 N P T N E K L Q Q F P N H H M F V L E Q  
481 GAAGAGTACAAGAAAGAGGAAATGAATGGGAGTTCACTGACTTTGGCATGGATTTGGCT  
1501 E E Y K K E G I E W E F I D F G M D L A  
501 GCCTGCATTGAGCTTATGAGAAGCAATGGGCATCTTCCATCTTGAAGAGGAGTGC  
1561 A C I E L I E K P M G I F S I L E E E C  
521 ATGTTCCCAAGGCAACAGACATGACCTTCAAGAACAACTGACAGCAGCATCTTGGG  
1621 M F P K A T D M T F K N K L Y D Q H L G  
541 AAAAAAAGTCAATTTGAAAAGCCAAAACCTGCCAAAAGCAAGCTGAGGCCATTTCTCT  
1681 K N K S F E K P K P A K G K A E A H F S  
561 CTGTTGCACTATGCTGGCACTGTGATTACAACATTTGTTGGCTGGCAGGAAAGCAAG  
1741 L V H Y A G T V D Y N I C G W L D K N K  
581 GATCCCTGAACGACTCAGTGGTTCAGCTTACCAGAAGTCTTCACTCAAACTGCTGGGT  
1801 D P L N D S V V Q L Y Q K S S V K L L G  
601 CACCTCTATGAGCAGATGCCGGAGCAGAAGCTGAGGGCGGTGGCAAAAAGCTGGCAAG  
1861 H L Y A A H A G A E A E G G G K K A G K  
621 AAGAAGGTTGGCTCCTTCCAGACTGTGCTGCTTTGTTCAAGGAGAAATTTGGGCAAGCTG  
1921 K K G G S F Q T V S A L F R E N L G K L  
641 ATGACCACTGAGGAGCACTCATCTCATTTGTACGTTGTTGATTCCCAATGAATCG  
1981 M T N L R S T H P H F V R C L I P N E S  
661 AAGACTCCAGTCTTATGGAGAATCTCTGGTCACTCCAGCTGAGGTTAAGCGTGTG  
2041 K T P G L M E N F L V I H Q L R C N G V  
681 CTGGAGGATCAGGATCTGTAGGAAAGGTTCCCGAGCAGAATCCTCTATGGTACTTC  
2101 L E G I R I C R K G F P S R I L Y G D F  
701 AAACAGAGATATAAGATTTGAATGCCAGTGTATCCAGAGGGACAGTTTATCGCAAC  
2161 K Q R Y K V L N A S V I P E G Q F I D N  
721 AAGAAGGCTCCGAGAAACTGCTGGATCCATCGATGGACCACTCAGTACAAGTTT  
2221 K K A S E K L L G S I D V D H T Q Y K F  
741 GGCCACCAAGGTGTTCTCAAAGCTGGTCTGCTGGAACTTGGAGGAGATGAGAGAT  
2281 G H T K V F F K A G L L G T L E E M R D  
761 GAGAAGTGGCTGCACTGGTCAATGACTCAGGCTCTGTCAGAGGTTACCTCATGAGA  
2341 E K L A A L V T M T Q A L C R G Y L M R  
781 CGCGAGTTGTCAAGATGATGAAAAGGAGAGGGCCATTTTCCATCCAGTACAACATC  
2401 R E F V K M M E R R E A I F S I Q Y N I  
801 CGCTATTCAATGATCAAACTTGGCCATGGATGAAGCTGACTTCAAGATTAAGCCCT  
2461 R S F M N V K T W P W M K L Y F K I K P  
821

2521 CTGCTGAAGAGTGCAGAGACTGAGAAAAGAGATGGCCCAATGAAAAGGACTTTGAAAAG  
 841 L L K S A E T E K E M A Q M K E D F E K  
 2581 ACCAAGGAAGACCTAACAAAGGCCCTGGCCAAGAAGAACTGGAGGAGAAGATGGTT  
 861 T K E D L T K A L A K K K E L E E K M V  
 2641 TCTCTCTGCAGAGAAAAATGATCTTGTGTGCAAGTGCAGTCTGAAGGTGAAAACCTC  
 881 S L L Q E K N D L L L Q V Q S E G E N L  
 2701 ACTGATGCTGAGAAAAGGTGTGAGGGGCTCATCAAAGCAAAAATCCAGCTTGAAGCCAAA  
 901 T D A E E R C E G L I K A K I Q L E A K  
 2761 CTCAAAGAGACACTGAGAGGCTGGAGGATGAGGAGAAAATGAATGCTGAGTTGACTGCA  
 921 L K E T T E R L E D E E E M N A E L T A  
 2821 AAGAAGAGGAAGCTGGAGGATGAGTGTCTGAGTTGAAGAAGGACATTGATGACCTGGAG  
 941 K K R K L E D E C S E L K K D I D D L E  
 2881 CTCACCTGGCAAAGGTGAAAAGGAGAAACATGCCACTGAGAACAAAGGTCAAAAACCTG  
 961 L T L A K V E K E K H A T E N K V K N L  
 2941 GTTGAGGAAATGGCATCTCAAGATGAGACCATGCAAGTTGACCAAAGAGAAGAAGCC  
 981 V E E M A S Q D E T I A K L T K E K K A  
 3001 CTCAGGAGGCCATCAGCAGTCTTGATGATCTGCAGGCAGAGAAAGCAAAAGTCAAC  
 1001 L Q E A H Q Q V L D D L Q A E E D K V N  
 3061 ACTCTGACAAAAGCCAAGCAAGCTGGAGCAGCAAGTGGACGATCTTGAAGGTCCCTG  
 1021 T L T K A K T K L E Q Q V D D L E G S L  
 3121 GAGCAAGAAAAGTCCGATGGATCTTGAGCGGGCAAAGGAAAGCTTGAAGGAGAT  
 1041 E Q E K K L R M D L E R A K R K L E G D  
 3181 CTGAAACTTGCCAGGAATCCATAATGGATCTTGAAAGCACAAGCAGCAGTCTGAGGAG  
 1061 L K L A Q E S I M D L E N D K Q Q S E E  
 3241 AAAATAAAGAAGGACTTTGAGATAAGCCAGCTCCTGGGTAAGATTGAGGATGAACAG  
 1081 K I K K K D F E I S Q L L G K I E D E Q  
 3301 TCTCTTGGAAATCCAGCTACAAAAAAGATAAAGAAGCTTCAAGGCTCGCATTGAGGAGCTG  
 1101 S L G I Q L Q K K I K E L Q A R I E E L  
 3361 GAGGAGGAGATTGAGGCTGAGAGGCTGCTCGGGCAAAGGTGAGAGAAGCAGAGGCTGAT  
 1121 E E E I E A E R A A R A K V E K Q R S D  
 3421 CTCTCCAGGAACTTGAGGAGATCAGCGAGAGGCTTGAAGAAGCTGGTGGAGCAACTGCA  
 1141 L S R E L E E I S E R L E E A G G A T A  
 3481 GCTCAGATTGAGATGAACAAGAAGCGGAGGCAGAGTTTCAAGCTGCGCCGTGATCTT  
 1161 A Q I E M N K K R E A E F Q K L R R D L  
 3541 GAAGAATCCACCTGCAGCAGAGGCCACCTCGGACGCTCTGCGCAAGAAGCAGGCTGAC  
 1181 E E S T L Q H E A T S A A L R K K Q A D  
 3601 AGTGTGGCAGAGCTGGGAGAACAGATCGATAACCTCCAGAGAGTCAAACAGAAGCTGGAG  
 1201 S V A E L G E Q I D N L Q R V K Q K L E  
 3661 AAAGAGAAAAGTGAATTCAGATGGAGATCGATGACCTCAGCAGCAATATGGAGTCTATC  
 1221 K E K S E F K M E I D D L S S N M E S I  
 3721 GCCAAATCAAAGGGAAACCTTGAAGAAGTTGTGCAGAACATTAGAAGATCAACTGAGTGA  
 1241 A K S K G N L E K L C R T L E D Q L S E  
 3781 CTCAAAATCAAAGAAATGATGAGAATGTCCTGAGTAAACGACTTCAAGTGTACAAAAAGCA  
 1261 L K S K N D E N V R Q L N D F S V Q K A  
 3841 AGACTTCAAACGAAAATGGTGAATTTGCGCTCAGCTGGAGGAGAAAAGGACTCTCGTT  
 1281 R L Q T E N G E I V R Q L E E K E A L V  
 3901 TCTCAGCTGACAAGGGCAAGCAGGCTTTTACCAGCAGATTGAGGAGCTGAAGAGGCAC  
 1301 S Q L T R G K Q A F T Q Q I E E L K R H  
 3961 ATAGAGGAGGAAGTTAAGGCCAAGAAGCCCTGGCTCATGCTGTTCAAGTCAAGCCGTCAT  
 1321 I E E E V K A K N A L A H A V Q S A R H  
 4021 GACTGCGACCTGCTCAGAGAGCAGTATGAGGAGGAGCAAGAGGCCAAGGCTGAGCTGCAG  
 1341 D C D L L R E Q Y E E E Q E A K A E L Q  
 4081 CGTGCACTGTCAAAGCCAACAGCGAGGTGGCTCAGTGGAGAACCAATACGAGACTGAT  
 1361 R A L S K A N S E V A Q W R T K Y E T D  
 4141 GCCATCCAGCGCACTGAGGAGCTGGAGGACGCTAAGAAGAAGCTTGCCAGCGTCTTCAG  
 1381 A I Q R T E E L E D A K K K L A Q R L Q  
 4201 GATGCTGAGGAGTCCATCGAGGCTGTGAACGCAAAATGTGCCTCTCTGGAAGAGCGAAA  
 1401 D A E E S I E A V N A K C A S L E K T K

```

4261 CAGAGACTGCAGGGTGAAGTGGAGGACCTGATGATCGATGTGGAGAGCTAATGCTCTA
1421 Q R L Q G E V E D L M I D V E R A N A L
4321 GCTGCTAACCTCGACAAGAAGCAAAGAACTTTGACAAGGTCCTGCAGAGTGAAGCAG
1441 A A N L D K K Q R N F D K V L A E W K Q
4381 AAGTATGAAGAGAGCCAGGCAGAGCTGGAAGGATCTCAAAAAGAAGCTCGTCTCTCAGC
1461 K Y E E S Q A E L E G S Q K F A R S L S
4441 ACTGAGATGTTCAAGCTGAAAAATTCATATGAAGAATCTTTGGATCACCTGGAGACATA
1481 T E M F K L K N S Y E E S L D H L E T I
4501 AAGAGGGAGAACAAAACCTTCAACAGGAGATCTCCGATTTAACTGAGCAAAATGGTGAG
1501 K R E N K N L Q Q E I S D L T E Q I G E
4561 AGTGGAAAAACCATTCATGAATGGAGAAAAGCAGAAAAGACTGCAGAGACAGAGAAGCAGC
1521 S G K T I H E L E K A K K T A E T E K T
4621 GAACTCCAGACTTCACCTGAAGAGGCAGAGGCTACCTGGAGCATGAGGAATCCAAGATT
1541 E L Q T S L E E A E A T L E H E E S K I
4681 CTCCGATTCAGCTTGAGCTCACTCAAGTCAAGAGTGAAAATGACAGAAAACCTGCAGAG
1561 L R I Q L E L T Q V K S E I D R K L A E
4741 AAGGACGAGGAGATTGAGCAGATCAAGAGAACAGCCAGAGAGTGATTGATCCATGCAG
1581 K D E E I E Q I K R N S Q R V I E S M Q
4801 ACCACTTTGGACGCTGAGGTGAGGACGAGAAATGATGCCCTGAGAATCAAGAAGAAGATG
1601 T T L D A E V R S R N D A L R I K K K M
4861 GAGGGAGACCTCAATGAGATGGAGATTCAGCTGAGTCAATGCCAACCCAGCAGCAGTGAA
1621 E G D L N E M E I Q L S H A N R Q A A E
4921 GCCAGAAACAGCTGCGAAACGTGAAGGACAGCTCAAGGATGCACAATGCACCTTGAT
1641 A Q K Q L R N V Q G Q L K D A Q L H L D
4981 GAAGCCATTAGAGGTGATGAAGAAATGAAAGAACAGGTTGCCATGGTGGAGCGCAGGAAC
1661 E A I R G H E E M K E Q V A M V E R R N
5041 AACCTGATGCTGGCTGAGATTGAGGAGCTGAGAGTTGCACTGGAGCAGACGGAGAGAGGC
1681 N L M L A E I E E L R V A L E Q T E R G
5101 CGCAAAGTGGCTGAACAGGAGCTGGTTGATGCCAGCAACGTTGGGACTACTGCACCTCT
1701 R K V A E Q E L V D A S E R V G L L H S
5161 CAGAATACCAGCCTCATCAACACCAAGAAAGAACTGGAGGCTGACCTTATACAGATCCAA
1721 Q N T S L I N T K K K L E A D L I Q I Q
5221 GGTGAAGTGGAAAGATTCTGTTCAGGAAGCAAGAAATGCTGAAGAAAAGGCCAAGAAGGCC
1741 G E V E D S V Q E A R N A E E K A K K A
5281 ATCACTGATGCTGCCATGATGCCAGAAGAGTTAAAGAAAAGCAGGACACCGAGGTCAT
1761 I T D A A M M A E E L K K E Q D T S G H
5341 TTGGAGAGGATGAAGAAGAACCTGGAGGTGACAGTGAAGGACCTGCAGACCGCTTGTGAT
1781 L E R M K K N L E V T V K D L Q H R L D
5401 GAAGCTGAGAATCTGGCCATGAAGGGCGCAAGAAGCAGCTCCAGAACTAGAGGTAGG
1801 E A E N L A M K G G K K Q L Q K L E A R
5461 GTTCGTGAATTTGGAGGCTGAAGTTGATGCTGAACAGGCGTGGTGTGATGCTATCAAG
1821 V R E L E A E V D A E Q R R G A D A I K
5521 GGAGTGCCTAAATATGAGAGAAGAGTAAAGAACTAACCTATCAGACTGAGGAGGACAGG
1841 G V R K Y E R R V K E L T Y Q T E E D R
5581 AAGAATATTGGTAGACTTCAGGATCTGGTGGACAAGCTGCAGCTCAAAGTGAATCTTAC
1861 K N I G R L Q D L V D K L Q L K V K S Y
5641 AAGAGACAGGCTGAAGAGGCTGAGGAGCAGGCCAACAGTACCTGTCCAGGTACAGGAGG
1881 K R Q A E E A E E Q A N S H L S R Y R R
5701 GTTCAGCATGAGATGGAGGAAGCTCAGGAGCGCGTGACATGTGCTGAGTCCCAGGTCAAC
1901 V Q H E M E E A Q E R A D I A E S Q V N
5761 AAGTTGAGGGCGAAGAGTGTGAAATGTCAAGACCAAGGAAGCAGAGGAGTGA
1921 K L R A K S R E I V K T K E A E E *
5815 GGAGGAAATCACGGGTTATACATTAACAGGAAATCATACAATATGACCATCTTGTACTT
5875 GTTCACTTTAGCATGTTAAACATGCTGTGATAGCCAAAAGTCAATAAAAAGATAGATAGTT
5935 CATTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTCTGCGTGTGATACCAGTCTTGCCTT
5995 ATAGTGAGTCGATTTAG

```

图 1 黄条鲮MyHC 的 cDNA 核苷酸序列和推导的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *S. aureovittata* MyHC cDNA

注: 方框表示 Src 同源区; 下划线表示 MYSc-class II; 双下划线表示 Myosin tail

度保守序列但也有一定差异序列(图 2)。使用 Mega 6.0 软件对不同物种的 MyHC 氨基酸序列按邻接法(N-J 法)建立了系统进化树(图 3)。从图 3 中可以看出黄条鲮 MyHC 与同为鲮属鱼类的高体鲮(*S.*

*dumerili*)MyHC 聚于一簇, 再与鲈形总目聚为一支, 这说明黄条鲮与高体鲮亲缘关系最近; 而人、小鼠、大鼠等在另一分支, 说明哺乳类、啮齿类与其亲缘关系较远(图 3)。

|    |   |      |
|----|---|------|
| CI | SKERALGKMVSLQEKNDLQLQVASEAENLSDAEERCEGLIKSKIQLEGKLETTERLED    | 931  |
| HS | KRKELEEKMTLMQEKNDLQLQVQAEADSLADAERCDQLIKTKIQLEAKIKEVTERAED    | 932  |
| MM | KRKELEEKMTLMQEKNDLQLQVQSEADSLADAERCDQLIKTKIQLEAKIKEVTERAED    | 935  |
| SA | KKKELEEKMVSLQEKNDLLQVQSEGENLDAEERCEGLIKAKIQLEAKIKETTERLED     | 929  |
| SD | KKKELEEKMVSLQEKNDLLQVQSEGENLDAEERCEGLIKAKIQLEAKIKETTERLED     | 929  |
| PO | KKKELEEKMVSLQEKNDLLQVQSEGENLDAEERCEGLIKAKIQLEAKIKETTERLED     | 928  |
|    | .:. . **:*:***** ** :* .:.*:*****: **:*:*****.*:*:* **        |      |
| CI | EEEINAELTAKKRKLEDECESELKKDIDDELETLAKVEKEKHATENKVKNLTEEMAAQDES | 991  |
| HS | EEEINAELTAKKRKLEDECESELKKDIDDELETLAKVEKEKHATENKVKNLTEEMAGLDET | 992  |
| MM | EEEINAELTAKKRKLEDECESELKKDIDDELETLAKVEKEKHATENKVKNLTEEMAGLDET | 995  |
| SA | EEEMNAELTAKKRKLEDECESELKKDIDDELETLAKVEKEKHATENKVKNLVEEMASQDET | 989  |
| SD | EEEMNAELTAKKRKLEDECESELKKDIDDELETLAKVEKEKHATENKVKNLVEEMASQDET | 989  |
| PO | EEEMNAELTAKKRKLEDECESELKKDIDDELETLAKVEKEKHATENKVKNLTEEMASQDET | 988  |
|    | ***:***** **:*:***** **:*:***** **:*:***** **:                |      |
| CI | IAKLTKEKKALQEAHQQTLDLQAEEDKVNTLTKSKTKLEQQVDDLEGSLEQEKLRMDL    | 1051 |
| HS | IAKLTKEKKALQEAHQQTLDLQAEEDKVNTLTKAKIKLEQQVDDLEGSLEQEKLRMDL    | 1052 |
| MM | IAKLTKEKKALQEAHQQTLDLQAEEDKVNTLTKAKIKLEQQVDDLEGSLEQEKLRMDL    | 1055 |
| SA | IAKLTKEKKALQEAHQVLDLQAEEDKVNTLTKAKTKLEQQVDDLEGSLEQEKLRMDL     | 1049 |
| SD | IAKLTKEKKALQEAHQVLDLQAEEDKVNTLTKAKTKLEQQVDDLEGSLEQEKLRMDL     | 1049 |
| PO | IAKLSKEKKALQEAHQQTLDLQAEEDKVNTLTKAKVKLEQQVDDLEGSLEQEKLRMDL    | 1048 |
|    | ***:***** **:*:***** **:*:***** **:*:***** **:                |      |
| CI | ERAKRKEGDLKLAQESIMDLENDKQSEEEKIKKDFETSQLLSKIEDEQSLGAQLQKKI    | 1111 |
| HS | ERAKRKEGDLKLAQESTMDIENDKQQLDEKIKKKEFEMSGLSKIEDEQALGMQLQKKI    | 1112 |
| MM | ERAKRKEGDLKLAQESTMDVENDKQQLDEKIKKKEFEMSNLQSKIEDEQALGMQLQKKI   | 1115 |
| SA | ERAKRKEGDLKLAQESIMDLENDKQSEEEKIKKDFEISQLLGGIEDEQSLGIQLQKKI    | 1109 |
| SD | ERAKRKEGDLKLAQESIMDLENDKQSEEEKIKKDFEISQLLGGIEDEQSLGIQLQKKI    | 1109 |
| PO | ERAKRKEGDLKLAQESIMDLENDKQSEEEKIKKDFEISQLLGGIEDEQSLGIQLQKKI    | 1108 |
|    | ***:***** **:*:***** **:*:***** **:*:***** **:                |      |
| CI | KELQARIEEEEEIEAERAAARAKVEKQRSDLSRELEEISERLEEAGGATAAQIGMKNKRE  | 1171 |
| HS | KELQARIEEEEEIEAERASRAKAEKQRSLSRELEEISERLEEAGGATSAQIEMNKKRE    | 1172 |
| MM | KELQARIEEEEEIEAERASRAKAEKQRSLSRELEEISERLEEAGGATSAQIEMNKKRE    | 1175 |
| SA | KELQARIEEEEEIEAERAAARAKVEKQRSLSRELEEISERLEEAGGATAAQIEMNKKRE   | 1169 |
| SD | KELQARIEEEEEIEAERAAARAKVEKQRSLSRELEEISERLEEAGGATAAQIEMNKKRE   | 1169 |
| PO | KELQARIEEEEEIEAERAAARAKVEKQRSLSRELEEISERLEEAGGATAAQIEMNKKRE   | 1168 |
|    | ***:***** **:*:***** **:*:***** **:*:***** **:                |      |
| CI | AEFQKLRRDLEESTLQHEATAAALRKKQADSVAELGEQIDNLQRVKQKLEKEKSEYKMEI  | 1231 |
| HS | AEFQKMRDLEESTLQHEATAATLRKKHADSVAELGEQIDNLQRVKQKLEKEKSEMMEI    | 1232 |
| MM | AEFQKMRDLEESTLQHEATAATLRKKHADSVAELGEQIDNLQRVKQKLEKEKSEMMEI    | 1235 |
| SA | AEFQKLRRDLEESTLQHEATAAALRKKQADSVAELGEQIDNLQRVKQKLEKEKSEYKMEI  | 1229 |
| SD | AEFQKLRRDLEESTLQHEATAAALRKKQADSVAELGEQIDNLQRVKQKLEKEKSEYKMEI  | 1229 |
| PO | AEFLKRRDLEESTLHHEATAAALRKKQADSTAEELGEQIDNLQRVKQKLEKEKSEYKMEI  | 1228 |
|    | ***:***** **:*:***** **:*:***** **:*:***** **:                |      |
| CI | DDLSSNMEAVAKAEANLEKMCRTLEDQLSEINPRNDGNLRQINDLSAQRARLQTENGEFG  | 1291 |
| HS | DDLASNMEVTSKAGNLEKMCRALEDQLSEIKTEEEQQRLINDLTAQRARLQTESGEYS    | 1292 |
| MM | DDLASNMEVTSKAGNLEKMCRTLEDQVSELKTEEEQQRLINELTAQRARLQTESGEYS    | 1295 |
| SA | DDLSSNMESIAKSGNLEKLCRTLEDQLSELKSKNDENVRQLNDFSVQKARLQTENGEIV   | 1289 |
| SD | DDLSSNMESIAKSGNLEKLCRTLEDQLSELKSKNDENVRQLNDFSVQKARLQTENGEIV   | 1289 |
| PO | DDLSSNMEVAKSKANLEKLCRTLEDQLSELKSKNDENVRQLNDFSVQKARLQTENGEIV   | 1288 |
|    | ***:***** **:*:***** **:*:***** **:*:***** **:                |      |

图2 黄条鲮与其他动物 MyHC tail1 结构域氨基酸序列的多重比较

Fig.2 Alignment of amino acid sequences of *S. aureovittata* and other reported MyHC tail1 domain sequences

注: 来自不同物种 MyHC 的氨基酸序列的 GenBank 登录号如下: CI: 草鱼 *Ctenopharyngodon idella* (ACA33869); SD: 高体鲮 *Seriola dumerili* (XP\_022602616); SA: 黄条鲮 *Seriola aureovittata* (AZQ1991); HS: 人 *Homo sapiens* (NM\_005963); MM: 小鼠 *Mus musculus* (NM\_030679); PO: 牙鲆 *Paralichthys olivaceus* (XP\_019957075); "\*"表示保守的氨基酸残基, "."表示相似性氨基酸

### 2.3 MyHC 组织表达及早期发育阶段的表达分析

采用 qRT-PCR 检测 MyHC 在黄条鲮的脑、垂体、肝脏、肌肉、脾脏、肾脏、鳃、心脏、胃、肠、头肾共 11 个组织的表达特征, 发现 MyHC 在黄条鲮脑、垂体、肝脏、脾脏、肾脏、鳃、心脏、胃、肠、头肾等 10 个组织中表达量相对较低, 而在肌肉组织中表达量最高, 且与其他组织中 MyHC 的表达量差异显著

( $P < 0.05$ ) (图 4)。

在胚胎发育的各个时期都能检测到 MyHC 的表达, 其中 MyHC 在 16 细胞期之前表达量较高, 随后显著下降 ( $P < 0.05$ ); 从原肠胚早期 MyHC 表达量开始再次升高, 胚体下包 2/3 期表达量显著升高, 至孵化期表达量达到峰值 ( $P < 0.05$ ) (图 5)。在仔稚幼鱼时期, MyHC 在孵化后的 20d 之前表达水平较低, 20d 后表达

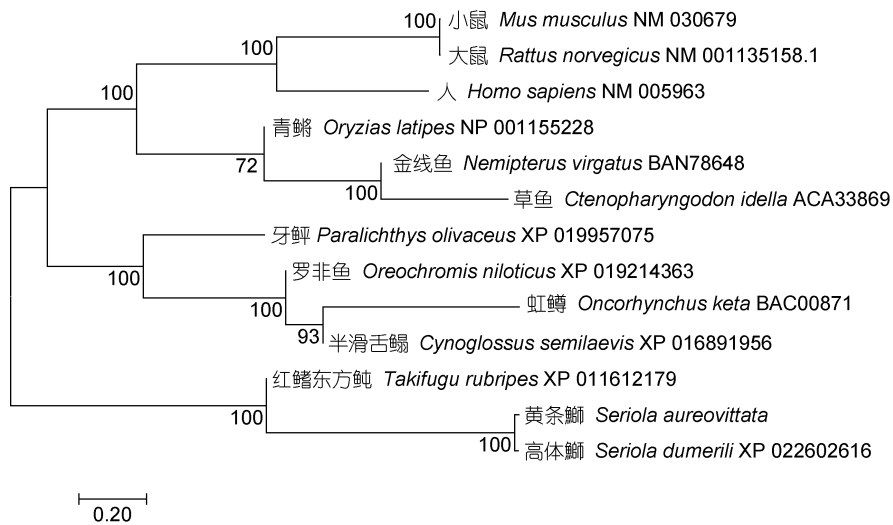


图 3 基于 MyHC 氨基酸序列的系统进化树(NJ 法, bootstraps=1000)

Fig.3 Phylogenetic analysis of *S. aureovittata* and other deduced MyHC amino acid sequences (neighbor-joining method, bootstraps=1000)

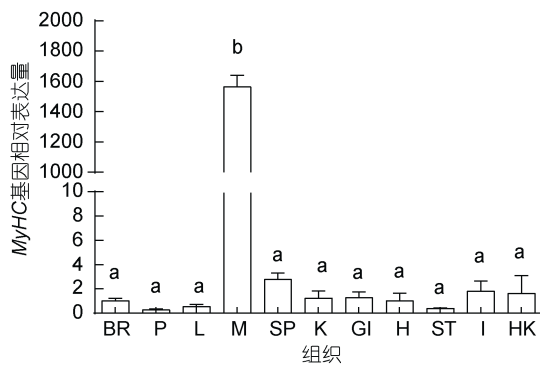


图 4 黄条鲷 MyHC 在各组织的相对表达量

Fig.4 The relative abundance of MyHC in different tissues of *S. aureovittata*

注: BR. 脑; P. 垂体; L. 肝脏; M. 肌肉; SP. 脾脏; K. 肾脏; GI. 鳃; H. 心脏; ST. 胃; I. 肠; HK. 头肾;  
柱上不同小写字母表示显著差异( $P < 0.05$ )

量显著升高( $P < 0.05$ ), 在 30d 表达水平达到峰值, 随后的 35d 到 40d 表达水平略有下降但仍保持较高表达趋势至 40d, 之后表达量显著下降但仍维持在较高水平( $P < 0.05$ ) (图 6)。

### 3 讨论

本研究通过 RT-PCR 及 RACE 方法获得了黄条鲷 MyHC 全长 cDNA 序列。黄条鲷 MyHC 具有典型的保守结构域(Kim *et al*, 2009)包含 MYSc-class II 和 Myosin-tail1。头部保守性较强, 是肌球蛋白家族的主要功能域, ATP 酶活性位点和肌动蛋白结合位点都位

于该区域。尾部则作为粗肌丝的结构支撑。在黄条鲷 MyHC 中还发现了 Src 同源区即 SH3 结构域, 其可以调节酶的活性, 并在蛋白质的亚细胞定位有重要调控作用(Mayer, 2001)。有研究表明具有 SH3 结构的 MyHC 还可以维持细胞骨架和协助细胞跨膜运动(Okrut *et al*, 2015)。通过多重序列比对分析发现, MyHC 氨基酸序列高度保守, 黄条鲷等几种鱼类与哺乳类(人)、啮齿类(小鼠) MyHC 序列相似性均在 70% 以上; 与同属鲈形目高体鲷的同源性高达 97.2%。系统进化树分析表明黄条鲷的 MyHC 与高体鲷聚为一

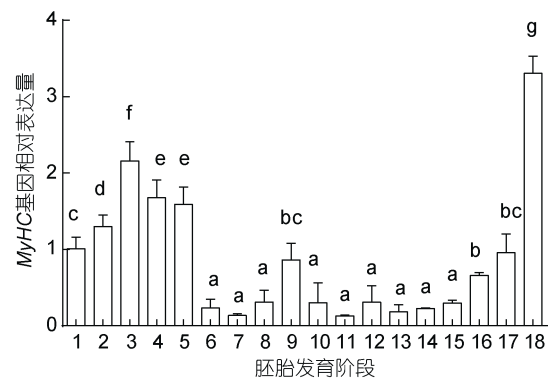


图 5 黄条鲷 MyHC 在胚胎发育时期的表达

Fig.5 Relative expression levels of MyHC in different embryonic stages of *S. aureovittata*

注: 1. 受精卵; 2. 2 细胞; 3. 4 细胞; 4. 8 细胞; 5. 16 细胞; 6. 32 细胞; 7. 多细胞; 8. 桑椹胚; 9. 高囊胚; 10. 低囊胚; 11. 原肠胚早期; 12. 原肠胚中期; 13. 原肠胚末期; 14. 神经胚; 15. 胚体下包 1/2; 16. 胚体下包 2/3; 17. 胚体全包; 18. 孵化期; 柱上不同小写字母表示显著差异( $P < 0.05$ ); 以受精卵 mRNA 表达量为标准 1



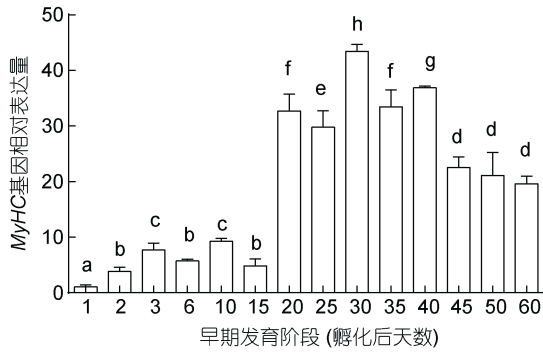


图6 黄条鲮MyHC在仔稚幼鱼发育阶段的表达

Fig.6 The expression levels of MyHC in larval and juvenile development stages of *S. aureovittata*

注: 柱子上不同小写字母表示显著差异 ( $P < 0.05$ ); 以孵化后 1d MyHC 表达量为标准 1

支, 再与鲈形总目聚为一支; 这也进一步证实本研究克隆获得的 cDNA 序列为黄条鲮MyHC 序列。

MyHC 在鱼类具有组织和发育不同阶段的表达特异性(Nord *et al.*, 2014; Schiaffino *et al.*, 2015)。本研究中, 黄条鲮MyHC 具有组织表达特异性, qRT-PCR 分析发现在肌肉组织中表达量最高, 在脑、垂体、肝脏、脾脏和肾脏等组织的表达量较低。在其他鱼类中 MyHC 组织表达具有各自的特征, 在红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 成鱼白肌和红肌中都检测到 MyHC 的表达, 在心肌中具有高表达(Akolkar *et al.*, 2010)。草鱼 MyHC 在红肌、白肌和心肌中高表达, 在肾脏、脾脏和肠表达量较低(Chu *et al.*, 2010)。翘嘴鲌 MyHC 在心肌、红肌中高表达, 白肌中无表达(易潭等, 2014)。在甲壳纲的脊尾白虾, MyHC 主要在肌肉中表达, 其次在眼柄、甲壳中表达。在腹足纲的瘤背石磺 (*Onchidium struma*), MyHC 在腹足和背部皮肤表达量最高, 肝胰腺、蛋白腺、两性腺中微量表达(顾冰宁等, 2018)。综上分析发现 MyHC 表达丰度高的组织为肌肉组织; 肌纤维体积决定了肌肉的生长发育, 而肌球蛋白是构成肌纤维主要结构蛋白和功能蛋白之一, 这也表明 MyHC 是促进黄条鲮肌肉生长的一个重要基因。

本研究中, MyHC 在黄条鲮细胞形成期表达量较高, 随后表达量有所下降; 从原肠胚早期 MyHC 表达量开始再次升高, 在胚体下包 2/3 期表达量显著升高, 且在孵化期表达量达到峰值。在草鱼胚胎发育阶段的研究发现, 从神经胚期到尾牙期 MyHC 表达逐步升高; 在孵化的仔鱼表达量最高(Chu *et al.*, 2010)。翘嘴鲌的 MyHC 在未受精卵有微量的表达, 在尾牙期表达量明

显升高, 随着胚胎发育, 表达量持续增加(陈之航等, 2017)。本研究结果与草鱼、翘嘴鲌的研究结果相似, 也进一步证实 MyHC 的表达变化与胚胎发育时期相关; 黄条鲮胚胎在胚体下包 2/3 后, 随着发育出现了肌肉效应, 此时需要肌球蛋白的参与, 并随着发育进程表达量增加。本课题组另有研究表明 PTEN 基因对黄条鲮的早期生长发育有抑止作用, PTEN 从黄条鲮受精卵到高囊胚表达量均较低(孙冉冉等, 2019)。在本研究中, MyHC 从黄条鲮受精卵到高囊胚表达量相对较高, 这预示 MyHC 对黄条鲮胚胎发育起到正向的调控作用。

已有的研究表明, 黄条鲮仔稚幼鱼在早期生长速度慢、后期生长速度快(Martínez-Montaña *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016)。黄条鲮受精卵孵化后 60d 内的仔稚幼鱼全长随着日龄的增加而加快增长, 孵化后 25d 后全长大幅增加(张正荣等, 2019)。MyHC 在黄条鲮仔稚幼鱼生长发育的各个阶段都有表达, 在孵化后 20d 显著升高, 此时为摄食卤虫无节幼体阶段, 随着鱼体新陈代谢变化和营养状态的改变, 肌肉增生和分化能力加强, 此时期 MyHC 的升高可能为肌肉生长提供分子基础。鱼类的骨骼肌可以特异的调整鱼体缓慢游动和快速游动。在鲤鱼 (*Cyprinus carpio* L.) 早期发育阶段, 研究发现 MyHC 表达水平在孵化后 30d 表达水平最高(Nihei *et al.*, 2006)。在本研究中孵化后 30d 时, MyHC 在黄条鲮的表达水平达到峰值, 这与鲤鱼的研究结果类似, MyHC 的高表达可能与黄条鲮运动能力和适应外界环境能力增强有关。孵化后 45d 后 MyHC 表达虽然显著下降但维持一个相对较高的表达水平, 此阶段黄条鲮生长速度也较快, 推测可能与 MyHC 的较高表达有关。以上研究结果说明 MyHC 基因对于黄条鲮胚胎发育及仔稚幼鱼的生长发育均有重要调控作用。

#### 4 结论

本研究对黄条鲮MyHC 基因进行了克隆、鉴定和生物学分析。黄条鲮MyHC 具有典型的保守结构域 MYSc-class II 和 Myosin-tail1。序列同源性比对分析发现黄条鲮MyHC 与高体鲮、牙鲮、草鱼的同源性分别为 97.2%、95.1%、76.7%。系统进化树分析结果表明黄条鲮MyHC 与高体鲮聚于一簇。qRT-PCR 分析发现 MyHC 在被检测的各组织中均有表达, 但在肌肉中表达量最高 ( $P < 0.05$ ); 在不同的胚胎发育时期和仔稚幼鱼发育阶段, 黄条鲮MyHC 表达具有发育阶段表达

的特异性。本研究结果表明 MyHC 参与调控了黄条鲮的早期生长发育。

### 参 考 文 献

- 王佳佳, 李 健, 葛倩倩等, 2019. 脊尾白虾肌球蛋白重链和肌球蛋白轻链基因的克隆与表达分析. 中国海洋大学学报, 49(1): 16—27
- 史 宝, 柳学周, 刘永山等, 2019a. 黄条鲮线粒体全基因组测序及结构特征分析. 中国水产科学, 26(3): 405—415
- 史 宝, 柳学周, 刘永山等, 2019b. 盐度渐变过程对黄条鲮(*Seriola aureovittata*)幼鱼渗透调节的影响. 海岸工程, 38(1): 63—70
- 孙冉冉, 史 宝, 柳学周等, 2019. 黄条鲮PTEN 基因克隆、组织分布及早期发育阶段的表达分析. 大连海洋大学学报, 34(1): 47—55
- 张正荣, 柳学周, 于 毅等, 2019. 黄条鲮仔稚幼鱼消化酶活性变化研究. 渔业科学进展, doi: 10.19663/j.issn2095-9869.20181211002
- 陈之航, 董浚键, 孙成飞等, 2017. 基于转录组测序对翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)2 种肌球蛋白重链基因的克隆与分析. 渔业科学进展, 38(3): 51—61
- 易 潭, 刘希良, 宾石玉等, 2014. 鳊鱼 *Siniperca chuatsi* 红肌 sMyHC1 基因 cDNA 的克隆及其表达分析. 广西师范大学学报: 自然科学版, 32(2): 175—180
- 柳学周, 徐永江, 李 荣等, 2017. 黄条鲮(*Seriola aureovittata*)肌肉营养成分分析与评价. 渔业科学进展, 38(1): 128—135
- 顾冰宁, 刘 欣, 沈和定等, 2018. 瘤背石磺肌球蛋白重链(MyHC)基因的克隆与表达分析. 渔业科学进展, 39(4): 126—138
- 徐永江, 张正荣, 柳学周等, 2019. 黄条鲮早期生长发育特征. 中国水产科学, 26(1): 172—182
- Akolkar D B, Kinoshita S, Yasmin L *et al*, 2010. Fibre type-specific expression patterns of myosin heavy chain genes in adult torafugu *Takifugu rubripes* muscles. Journal of Experimental Biology, 213(1): 137—145
- Biga P R, Meyer J, 2009. Growth hormone differentially regulates growth and growth-related gene expression in closely related fish species. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 154: 465—473
- Campion L A, Choi S, Mistry H L *et al*, 2012. Myosin heavy chain and parvalbumin expression in swimming and feeding muscles of centrarchid fishes: the molecular basis of the scaling of contractile properties. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 163(2): 223—230
- Chu W Y, Fu G H, Bing S Y *et al*, 2010. Molecular cloning and mRNA expression analysis of myosin heavy chain (MyHC) from fast skeletal muscle of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 28(2): 239—247
- Heissler S M, Sellers J R, 2016. Kinetic adaptations of myosins for their diverse cellular functions. Traffic, 17(8): 839—859
- Hevroy E M, Jordal A E O, Hordvik I *et al*, 2006. Myosin heavy chain mRNA expression correlates higher with muscle protein accretion than growth in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture, 252(2—4): 453—461
- Kim H J, Güth R, Jonsson C B *et al*, 2009. *S. macrurus* Myogenic Regulatory Factors (MRFs) induce mammalian skeletal muscle differentiation; evidence for functional conservation of MRFs. The International Journal of Developmental Biology, 53(7): 993—1002
- Knight A E, Molloy J E, 2000. Muscle, myosin and single molecules. Essays in Biochemistry, 35: 43—59
- 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
- Martínez-Montaño E, González-Álvarez K, Lazo J P *et al*, 2016. Morphological development and allometric growth of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* V. larvae under culture conditions. Aquaculture Research, 47(4): 1277—1287
- Mayer B J, 2001. SH3 domains: complexity in moderation. Journal of Cell Science, 114(7): 1253—1263
- Nihe Y, Kobiyama A, Ikeda D *et al*, 2006. Molecular cloning and mRNA expression analysis of carp embryonic, slow and cardiac myosin heavy chain isoforms. Journal of Experimental Biology, 209: 188—198
- Nord H, Burguiere A C, Muck J *et al*, 2014. Differential regulation of myosin heavy chains defines new muscle domains in zebrafish. Molecular Biology of the Cell, 25(8): 1384—1395
- Okrot J, Prakash S, Wu Q *et al*, 2015. Allosteric N-WASP activation by an inter-SH3 domain linker in Nck. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(47): E6436—E6445
- Schiaffino S, Rossi A C, Smerdu V *et al*, 2015. Developmental myosins: expression patterns and functional significance. Skeletal Muscle, 5: 22
- Yang S G, Hur S W, Ji S C *et al*, 2016. Morphological development of embryo, larvae and juvenile in yellowtail kingfish, *Seriola lalandi*. Development & Reproduction, 20(2): 131—140

## MOLECULAR CLONING AND mRNA EXPRESSION OF *MYHC* GENE IN THE EARLY DEVELOPMENT OF YELLOWTAIL KINGFISH *SERIOLA AUREOVITTATA*

SHI Bao<sup>1</sup>, SUN Ran-Ran<sup>1,2</sup>, LIU Xue-Zhou<sup>1,2</sup>, XU Yong-Jiang<sup>1</sup>, JIANG Yan<sup>1</sup>,  
WANG Bin<sup>1</sup>, ZHANG Zheng-Rong<sup>1</sup>

(1. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract** The myosin heavy chain (MyHC) is one of the major structural and contractile proteins of muscle. Study on the early growth and development and gene resources is relatively lacking in yellowtail kingfish *Seriola aureovittata*. To understand the regulatory roles of *MyHC* in the early growth and development of *S. aureovittata*, the full-length cDNA sequences of *MyHC* was cloned by the RACE technology. The real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression patterns of *MyHC* in different tissues, embryonic development stages, and larval and juvenile stages. The full length of the MyHC cDNA sequence was 6143bp, and the open reading frame was 5811bp, encoding 1936 amino acids. Additionally, common features were found in the *MyHC* of *S. aureovittata*, including MYSc-class II, myosin tail I and SH3 domain. Molecular phylogenetic analysis confirmed that *S. aureovittata* was closely related to greater amberjack *S. dumerili*. *MyHC* was expressed in various tissues, but it had the highest expression in muscle. Developmentally, there was a gradual increase in *MyHC* expression before the 16-cell stage. And the expression of *MyHC* increased significantly in the embryo encircling 2/3 of yolk sac, and reached the peak in the hatching larva ( $P<0.05$ ). In the larval and juvenile stages, *MyHC* was significantly up-regulated on 20 days post hatching (dph), with peak expression occurring on 30 dph and decreased slightly between 35 and 45 dph ( $P<0.05$ ). The *MyHC* expression of *S. aureovittata* showed a development-stage-specific characteristic. Therefore, *MyHC* plays a regulatory role in the embryo and early developmental stage of *S. aureovittata*.

**Key words** *Seriola aureovittata*; *MyHC*; embryonic development; larval and juvenile development; gene cloning; expression analysis