

# 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)*Cathepsin L* 基因 cDNA 片段的克隆与稳定性研究\*

赵进<sup>1</sup> 郭应建<sup>1</sup> 励建荣<sup>2,3</sup> 崔林<sup>1</sup> 葛建<sup>1</sup>

(1. 中国计量学院生命科学院 浙江省海洋食品加工质量控制技术与仪器工程实验室 杭州 310018; 2. 浙江工商大学食品与生物工程学院 浙江省食品安全重点实验室 杭州 310035; 3. 辽宁省食品安全重点实验室 渤海大学 锦州 121013)

**摘要** 采用 RACE-PCR 和 RT-PCR 方法获得大黄鱼组织蛋白酶 L(*Cathepsin L*) 基因的 cDNA 中间片段, 片段长度为 773bp。BLAST 分析显示, 大黄鱼 *Cathepsin L* 基因 cDNA 片段与鲢鱼的同源性最高达到 95%, 与斑马鱼同源性为 80%。实时定量分析了大黄鱼 *Cathepsin L* 基因在宰杀当天和冷藏期间的 mRNA 水平, 结果表明, 大黄鱼 0℃ 条件下冷藏 0、5、10、15、20d 肌肉中 mRNA 都具有相对稳定性, 但是含量水平有差异并且是呈现下降趋势, 宰杀当天的大黄鱼肌肉中 *Cathepsin L* 基因 mRNA 含量水平最高, 与冷藏 5、10、15、20d 的 *Cathepsin L* 基因 mRNA 水平差异性极显著 ( $P < 0.01$ ), 冷藏 5d 的 *Cathepsin L* 基因 mRNA 水平与 15、20d 的水平也达到了极显著水平 ( $P < 0.01$ )。同时结果表明, 在不同储藏时间 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 含量水平与肌肉 TPA 和 pH 等也表现了高度的相关性, 表明 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 含量可以作为评价大黄鱼冷藏期间肉品质指标的可行性和准确性。

**关键词** 大黄鱼, 冷藏, *Cathepsin L*, mRNA 稳定性, 肉质指标

**中图分类号** S432.1

我国水产品总产量已经连续 19 年居世界第一位, 其中鱼类产量达到 2862.8 万 t, 占世界总产量的 13% (Li *et al*, 2009)。由于鱼肉富含营养物质和水分, 肌肉组织脆弱, 内源性蛋白酶活跃, 自溶作用速度快, 极易在物理、化学、微生物等方面发生变化, 使肌肉品质降低, 最终导致腐败。鱼宰后在不同储藏期间, 由于鱼种类不同, 其鱼肉降解和品质降低的速度也不尽相同。这个过程中鱼肉内源蛋白酶激活了不同的蛋白水解反应, 产生了促进细菌后续增殖的营养素 (Delbarre-Ladrat *et al*, 2006)。最近的一些研究结果表明, 在鱼死后贮藏期间, 组织蛋白酶是溶酶体中发挥重要作用的蛋白酶, 是造成鱼肉蛋白质品质下降的主要酶 (Delbarre-Ladrat *et al*, 2006; Chéret *et al*, 2007)。组织蛋白酶 L 相比于组织蛋白酶 D 对肉肉的

自溶过程影响更大, 而且已证实组织蛋白酶 L 能消化肌纤维蛋白(肌动球蛋白)和结缔组织(Ogata *et al*, 1998)。

目前, 只有少数报道组织蛋白酶 L 的基因被克隆并且进行了测序, 如: 国内研究组织蛋白酶 L 基因的有凡纳滨对虾等(曾地刚等, 2008; 马宁等, 2008; 李娟等, 2011; 白志毅等, 2011; 鄢荣歆等, 2009); 国外的研究有乌颊鱼(*Sparus auratus*)(Carnevali *et al*, 2008), 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Kwon *et al*, 2001), 普通鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(Tsunemoto *et al*, 2004)和河鲢(*Ictalurus punctatus*)(Yeh *et al*, 2009)。大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)属硬骨鱼纲、鲈形目、石首鱼科、黄鱼属, 为传统“四大海产”(大黄鱼、小黄鱼、带鱼、乌贼)之一, 是我国特有的名贵优质鱼类。现今,

\* 国家自然科学基金项目, 31071514 号, 31100499 号; 浙江省教育厅项目, Y201122744 号。赵进, 博士研究生, E-mail: zhaojin@cjlu.edu.cn

通讯作者: 葛建, 博士, 副教授, E-mail: gejian16888@163.com

收稿日期: 2011-09-15, 收修改稿日期: 2011-11-12

我国大黄鱼养殖约网箱 50 万个, 年产量 7 万 t, 产值 30 多亿元, 从业人员达 80 万, 是国内海水网箱养殖产量最大的鱼类品种, 在东南亚等地也已形成“大黄鱼文化”色彩浓厚的消费市场(HUAQING *et al.*, 2008)。

Seear 等(2008)是首位分析鱼宰杀后肌肉中 RNA 的完整性的研究者。作者提出大黄鱼 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 在鱼宰杀后冷藏期间的相对稳定性的观点, 分析大黄鱼 mRNA 在宰后储藏期间的变化趋势及其与鱼肉质品质的相关性。本研究克隆和获得了大黄鱼 *Cathepsin L* 基因 cDNA 序列, 运用实时荧光定量 PCR 得到 *Cathepsin L* 基因在大黄鱼不同冷藏期间肌肉中 mRNA 的相对水平, 以期揭示大黄鱼 mRNA 稳定性的内在机理奠定基础。目的是通过量化宰后大黄鱼样品的 mRNA 降解水平, 将 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 水平作为一种能客观准确评定冷藏期鱼肉品质性状的新指标。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

购买自杭州高沙农贸市场内养殖大黄鱼活鱼 5 尾, 鱼体质量为(700±30)g 左右。

活鱼运至浙江省海洋食品加工质量控制技术与仪器工程实验室, 立即进行低温处理 30min 致死, 分别取鱼背部轴上躯干肌的白色肌肉组织的一部分。接下来, 对肌肉进行快速切片后放于真空包装袋内, 以防止与周围环境接触, 样品避免污染。每尾鱼取 5 块肌肉, 一共取了 25 块鱼片样品, 鱼片分别在 0℃ 条件下贮藏 0、5、10、15 和 20d。

在 0、5、10、15 和 20d 固定时间点取鱼背部肌肉样品, 每次取鱼肉样品 5 块, 立即液氮冻存, 用于分析 *Cathepsin L* 基因在储藏时期内肌肉组织中的定量变化。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 DNA、RNA 的提取和 cDNA 的合成 按上

海生物工程有限公司提供试剂盒, 按照说明书提取总 RNA, 琼脂糖电泳检测完整性, 核酸定量仪检测浓度和纯度。

cDNA 的合成依照 M-MLV 反转录酶的说明进行操作(Promega)。50μl 的反转录体系中含 2μg 的总 RNA, 反转录得到的 cDNA 稀释 5 倍保存于-20℃ 备用。

#### 1.2.2 *Cathepsin L* 基因 cDNA 片段的同源克隆和 blast 分析

根据已经报道的硬骨鱼类 *Cathepsin L* 基因序列, 参考 GenBank 数据库中尖吻鲈 *Lates calcarifer* (GenBank 登录号: AY795481)和斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus* (GenBank 登录号: EU915299)的 *Cathepsin L* 基因保守区并且设计简并引物(表 1), 用于同源 cDNA 片段的克隆。大黄鱼肌肉组织的总 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 扩增条件和体系如下所述。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收试剂盒(TIANGEN)进行纯化, 克隆到 pUCm-T 载体(TaKaRa), 转化入 JM109 感受态细胞, 将阳性克隆送往上海生物工程有限公司进行测序。

根据 GenBank 上已经提交的鱼类 cDNA 序列, 在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)上通过 BLAST 进行比较分析 *Cathepsin L* cDNA 序列。

(1) 在 200μl RNase-free 的离心管中混合下列成分: Total RNA 2μg, Oligo(dT)<sub>18</sub> 1μl, dNTPs (10mmol/L) 1μl, 加 DEPC 处理水至 15μl; 70℃, 5min 变性, 立即放到冰上。然后依次加入下列试剂: 5×First-strand Buffer 4μl, 0.1M DTT 2μl, RNase inhibitor 25units, SuperScript™ II RTase 200units, 混合上述成分, 离心, 42℃ 温育 1h, -20 长期保存。

#### (2) PCR 扩增反应

第一轮 PCR 反应体系为 25μl: 包含大黄鱼 cDNA(原液)0.5μl, *Cathepsin L*-F1 (10μmol/L) 1.0μl、*Cathepsin L* -R1 (10μmol/L) 1.0μl, Platin μmol/L PCR Supermix High Fidelity (Invitrogen) 22.5μl。反应条件是 94℃, 2min; 35cycles: 94℃, 30s; 58℃, 30s; 68℃, 1min。

表 1 大黄鱼 *Cathepsin L* 基因 cDNA 片段扩增所用的引物  
Tab.1 Primers used for amplifying cDNA segments of *Cathepsin L* gene in *P. crocea*

引物名称	引物序列(5'—3')	用途
<i>Cathepsin L</i> -F1	GDVTGRTBTGGGAGAWRAAC	扩增中间片段
<i>Cathepsin L</i> -F2	ATGAAYCRBTTYGGDGAYATG	扩增中间片段
<i>Cathepsin L</i> -R1	TRGCRATVCCACASYGGTTBT	扩增中间片段
<i>Cathepsin L</i> -R2	CCAGCTGTTHTTBACRATCCA	扩增中间片段

注: R=A/G, Y=C/T, S=C/G, W=A/T, H=A/C/T, B=C/G/T, V=A/C/G, D=A/G/T

第二轮 PCR 反应体系为 25 $\mu$ l。包含: 第一轮 PCR 产物 0.5 $\mu$ l, *Cathepsin L*-F2 (10 $\mu$ mol/L) 1.0 $\mu$ l、*Cathepsin L*-R2 (10 $\mu$ mol/L) 1.0 $\mu$ l, Platin  $\mu$ mol/L PCR Supermix High Fidelity (Invitrogen) 22.5 $\mu$ l。反应条件是 94 $^{\circ}$ C, 2min; 35cycles: 94 $^{\circ}$ C, 30s; 62 $^{\circ}$ C, 30s; 68 $^{\circ}$ C, 40s。

### 1.3 实时定量 PCR

根据得到的大黄鱼 *Cathepsin L* 基因的部分 cDNA 片段, 设计一对表达分析引物(如表 2), 进行实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)。采样 iQ<sup>TM</sup>5 多重实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad)进行相对定量分析, 内参用 Beta-Actin 基因片段(表 2)。利用 ddCT 法对 *Cathepsin L* 基因在大黄鱼鱼片贮藏时间内肌肉组织中的 mRNA 水平进行了分析。

购买 TaKaRa 公司试剂: SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup>

(Perfect Real Time); 实验过程如下:

#### (1) 实时定量 RT-PCR 引物设计和合成

采用 Primer Premier 6.0 和 Beacon designer 软件进行荧光引物的设计, 然后由上海生物工程有限公司负责合成(引物序列见表 2)。

#### (2) 实时定量 RT-PCR 扩增体系和反应条件

反应体系 25 $\mu$ l: ddH<sub>2</sub>O 10.5 $\mu$ l, SYBR Premix ex Taq<sup>TM</sup> (2 $\times$ ) 12.5 $\mu$ l, PCR-F (10 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ l, PCR-R (10 $\mu$ mol/L) 0.5 $\mu$ l, 模板 cDNA 1 $\mu$ l。

反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 1min; 45 个循环: 95 $^{\circ}$ C 10s, 60—63 $^{\circ}$ C 25s (收集荧光), 熔点曲线分析 55—95 $^{\circ}$ C。

#### (3) 实时定量 RT-PCR 基因表达差异的数据统计

每次样品测定重复三次, 各个基因的相对表达水平以  $2^{-(Ct_{\text{内参基因}} - Ct_{\text{目的基因}})}$  进行统计分析。

表 2 大黄鱼 *Cathepsin L* 基因实时定量 PCR 所用的引物  
Tab.2 Primers used for RT-PCR amplification of *Cathepsin L* gene in *P. crocea*

基因	基因序列号	引物序列(5'→3')	退火温度( $^{\circ}$ C)
<i>Cathepsin L</i>	JN835256	F: CAGGGTCAGTGTGGCTCTTGCT R: CGTTGCCCTCTGGTCTGGAACA	63
Beta-Actin	EU443733	F: GACCTGACAGACTACCTCATG R: AGTTGAAGGTGGTCTCGTGGA	60

### 1.4 大黄鱼冷藏期间鱼片肉质性状指标的测定

**1.4.1 pH 测定** 依照 GB/T 5009.45-2003 中的酸度计法, 称取 10g 搅碎鱼肉, 加入新煮沸后冷却的双蒸水 100ml, 均质后过滤, 用实验室 pH 计(PHS-3B, 成都瑞驰分析控制仪器有限公司)测其 pH。每次测 5 个样品, 取平均值。

**1.4.2 TPA 测定** 参照王彦波等(2010)表述的方法, 用质构仪(CT3 质构仪, 天津市德盟科技有限公司)的平底柱型探头 p/5 (5mm 直径)压缩样品 2 次, 采用质地多面剖析(TPA)模式, 进行硬度、弹性、咀嚼性、胶黏性、凝聚性等质构指标。取鱼片切成 1.5cm<sup>3</sup> 的立方体为样品, 设定参数为: 测量前探头下降速度: 5.0mm/s; 测试速度: 2.0mm/s; 测量后探头回程速度: 5.0mm/s; 针入距离: 6mm; 触发力值: 5.0g。每次测 5 个样品, 每个样品测 2 次, 取平均值。

### 1.5 制图和数据分析

采用 Origin 8.0 绘图, SPSS 18.0 进行方差分析。 $P < 0.01$  为差异极显著,  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 大黄鱼样品总 RNA 提取和检测

提取完整性好、纯度高的 RNA 是检测基因表达

情况的关键。核酸蛋白分析仪检测 RNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值均在 1.9 左右, 说明 RNA 的纯度较高。表 3 为总 RNA 的纯度和浓度。

表 3 大黄鱼样品总 RNA 含量和纯度  
Tab.3 Content and purity of total RNA extracting from *P. crocea* sample

样品	A <sub>260</sub>	A <sub>260/280</sub>	浓度(ng/ $\mu$ l)
大黄鱼	7.91	1.89	316.25

### 2.2 大黄鱼 *Cathepsin L* 基因 cDNA 片段克隆与序列分析

**2.2.1 *Cathepsin L* 基因片段 cDNA 克隆** 以大黄鱼 cDNA 为模板, 利用简并引物 *Cathepsin L*-F1、*Cathepsin L*-F2 和 *Cathepsin L*-R1、*Cathepsin L*-R2 扩增获得了一条长约 773bp 的特异性条带, 与预期大小相同(图 1)。

#### 2.2.2 大黄鱼 *Cathepsin L* 基因 cDNA 片段序列分析

根据表 1 设计的引物 *Cathepsin L*-F1、*Cathepsin L*-R1 和 *Cathepsin L*-F2、*Cathepsin L*-R2, 扩增后获得 2 个 cDNA 合成片段具有部分重叠区域, 将所得 *Cathepsin L* 基因 cDNA 片段克隆测序并去除冗余序列后, 用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序进行电子拼

接, 获得一条长约 773bp 的基因序列(如图 2 所示)。

通过同源克隆, 测序得到 773bp 的 cDNA 片段, 经过 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 搜索, 发现此片段与条石鲷 *Cathepsin L* 基因有 91% 的同源性, 与鲢鱼 *Cathepsin L* 基因同源性达到 95%, 与斑马鱼 *Cathepsin L* 基因同源性最低也达到 80%, 与其它鱼类同源性如表 4 所示。这个片段被确定为大黄鱼 *Cathepsin L* 基因片段, 该基因序列已在 GenBank 注册, 获得序列号为 JN835256。

### 2.3 大黄鱼储藏期间 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 相对水平分析

如图 3 所示, 低温储藏过程中, 大黄鱼肌肉中 *Cathepsin L* 基因 mRNA 相对水平总体表现为明显降低。结果表明, 大黄鱼 0℃ 条件下冷藏 0、5、10、15、20d 肌肉中 mRNA 水平具有相对稳定性, 但是含量水平有差异并且是呈现下降趋势, 宰杀当天的大黄鱼肌肉中 *Cathepsin L* 基因 mRNA 含量水平最高, 与冷藏 5、10、15、20d 的 *Cathepsin L* 基因 mRNA 水平差异性极显著 ( $P < 0.01$ ), 冷藏 5d 的 *Cathepsin L* 基因 mRNA 水平与 15、20d 的水平也达到了极显著

5'-GAATGGTTTGGGAGATGAACCTTAGGAAGATCGAGCTGCACAACCTAGAGCACTCCATGGGAAAACTCCTACCGGCTGGGCATGAACCACTTTGGAGACATGACTCAGAGGAGTTCAGGCAGATCATGAACGGCTACAAGCGCAAGGCTGAGGGGAAGTTCAGGGGTCTCTGTCATGGAGCCCAACTTCTAGAGGCACACGTGCCGTGGACTGGAGGGACAATGGTTACGTGACTCCCGTTAAGGACCAGGGTCAGTGTGGCTCTTGCTGGCCTTCAGCACCACCGGTGCTCTGGAGGGTCAGCACTTTAGGAAGACCGGCAAACTGGTGTCTGCTGAGCGAACAGAACTTGGTGGACTGTTCCAGACCAGAGGGCAACGAGGGCTGCAATGGTGGTCTGATGGACCAGGCTTTCAGTACGTCAAGGACAACCACGGCCTGGACTCCGAGGACTCTTATCCTTACCTTGGAACTGATGACCAGCCATGTCACCTACGACCCCAACTACAACCTTGCCAACGACACCGGATTCGTCGATGTCCCCAGTGGCAAGGAGCATGCCTTATGAAGCCGTGGCAGCTGTGGGCGCTGTTTCAGTCGCTATCAGTGTGGTTCATGAGTCTTCCAATTTACCAATCAGGAATCTACTATGAGAAGGACTGCAGCAGTGAGGAGTTGGACCACGGTGTGCTGGTGGTGGGATATGGCTTTGAGGGAGAAAGACGTGGACGGCAAGAAATACTGGATCGTGAATAACAGCTGG-3'

图 2 大黄鱼 *Cathepsin L* 基因 cDNA 片段序列  
Fig.2 cDNA fragment of *Cathepsin L* gene in *P. crocea*

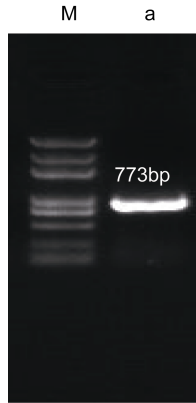


图 1 大黄鱼 *Cathepsin L* 基因 cDNA 扩增结果  
Fig.1 The amplified result of cDNA sequence of *Cathepsin L* gene in *P. crocea*  
M: DNA 标准 (DL2000)(自上至下分别为 3000、2500、2000、1000、750、500、250、100bp); a: *Cathepsin L* 片段扩增产物

表 4 Blast 分析大黄鱼 *Cathepsin L* 基因序列  
Tab.4 Blast analyse cDNA sequence of *Cathepsin L* gene in *P. crocea*

GenBank 序列号	同源性(%)	物种名称
GQ903767.1	91	条石鲷 <i>Oplegnathus fasciatus</i>
HM582421.1	95	鲢鱼 <i>Miichthys miiuy</i>
FJ807676.1	89	舌齿鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>
EU143238.1	89	尖吻鲈 <i>Lates calarifer</i>
XM_003444483.1	86	罗非鱼 <i>tilapia</i>
JF772216.1	85	半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>
NM_212584.1	80	斑马鱼 <i>zebra fish</i>

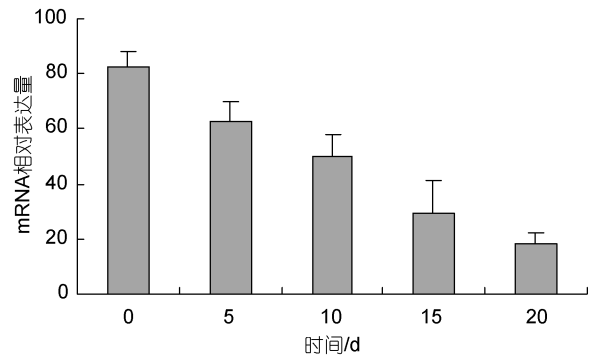


图 3 大黄鱼在 0℃ 贮藏过程中 *Cathepsin L* 基因 mRNA 水平  
Fig.3 mRNA levels of *Cathepsin L* gene in *P. crocea* during cold storage at 0°C

水平 ( $P < 0.01$ )。同时可知, 大黄鱼的 *Cathepsin L* 基因 mRNA 含量与冷藏时间呈现高度负相关性 ( $r = -0.996$ ), 具有显著的时间依赖性, 冷藏时间对 mRNA 降解有重要的影响作用。

### 2.4 大黄鱼片储藏期间 *Cathepsin L* 基因 mRNA 含量与肉质指标的关联性

**2.4.1 pH** 养殖大黄鱼在 0℃ 贮藏过程中, 不同时间点的 pH 如表 5 所示。由表 5 可以明显看出大黄鱼肌肉 pH 随冷藏时间的延长, 呈不断上升趋势。

**2.4.2 TPA** 鱼肉质构参数为 TPA, 包含的相关参数硬度(Hardness)、粘着性(Adhesiveness)、弹性(Springiness)、咀嚼性(Cheewiness)、胶粘度(Gumminess)、凝聚性(Cohesiveness)、回复性(Resilience)。养殖大黄鱼鱼片在 0℃ 贮藏期间质构参数变化结果如表 6 所示。

从表 6 中可以发现, H(硬度)、S(弹性)、C(咀嚼性)、G(胶粘性)指标总体呈下降的趋势, A(粘着性)、Co(凝聚性)以及 R(回复性)在冷藏期间在宰杀后第 5 天下降, 之后又有回升的趋势。

**2.4.3 大黄鱼储藏期间 *Cathepsin L* 基因 mRNA 含量与肉质指标的关联性** 养殖大黄鱼鱼片在 0℃ 贮藏过程中 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 含量与肉质性状的相关系数如表 7 所示。通过 SPSS 单因素方差分析 TPA 指标与 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 水平的关联性, 结果表明 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 水平与硬度、弹性、胶粘性、咀嚼性相关系数  $r$  分别为 0.892、0.840、0.862、0.796。研究结果证实随储藏时间的延长, 大黄鱼肌肉中 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 含量水平不断下降, 与 TPA 参数显示为相应高度正相关性。

### 3 讨论

#### 3.1 大黄鱼鱼片储藏期间 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 相对水平

目前, 水生动物中关于组织蛋白酶 L 的研究还相对较少。李娟等(2011)在海湾扇贝上测定了 *Cathepsin L* 基因编码区全长, 经序列比对与分析发现该基因的

蛋白序列与许多物种同源序列十分相似, 具有多个组织蛋白酶 L 的特征结构。这表明该基因在进化上比较保守, 也与本研究结果相一致。而本研究利用 *Cathepsin L* 基因在不同鱼种中相关序列保守性, 通过检测大黄鱼宰杀当天的总 RNA, 应用逆转录法和实时定量 RT-PCR 技术, 克隆和确证大黄鱼特有 *Cathepsin L* 基因序列及其 mRNA 含量水平。研究结果表明, 宰杀当天的大黄鱼肌肉中 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 水平相比于冷藏 5d 水平的差异性显著 ( $P<0.05$ ), 与 10d、15d、20d 的水平相比差异性达到极显著水平 ( $P<0.01$ ), 冷藏 5d 的 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 水平与 15d、20d 的水平也达到了极显著水平 ( $P<0.01$ )。

同时, 由表 7 可知, 大黄鱼的 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 含量与冷藏时间呈现高度负相关性 ( $r = -0.996$ ), 这些结果表明, 不同冷藏时间内, *Cathepsin L* 基因 mRNA 相对水平呈下降趋势, 具有一定的相对稳定

表 5 大黄鱼片在 0℃ 贮藏过程中 pH 的变化

Tab.5 The pH value changes of *P. crocea* fillets during cold storage at 0℃

冷藏时间	0d	5d	10d	15d	20d
pH	7.19±0.0444	7.32±0.0580	7.41±0.0472	7.53±0.0522	7.61±0.1006

表 6 大黄鱼片在 0℃ 贮藏过程中 TPA 的变化

Tab.6 The TPA Changes of *P. crocea* fillets during cold storage at 0℃

时间(d)	H(硬度)	A(粘着性)	S(弹性)	C(咀嚼性)	G(胶粘度)	Co(凝聚性)	R(回复性)
0	305.62±19.0080	-11.56±9.463	0.95±0.1432	131.90±25.9500	139.69±23.9258	0.46±0.0575	0.23±0.0515
5	294.47±20.3488	-23.37±12.9777	0.95±0.1705	118.35±29.1579	123.59±15.6531	0.42±0.0650	0.15±0.0295
10	258.11±26.212	-17.22±10.6668	0.86±0.0526	99.41±10.6596	114.82±9.7168	0.45±0.0358	0.15±0.0200
15	264.25±16.4319	-10.38±3.7738	0.89±0.0431	107.83±8.7864	121.48±11.5936	0.46±0.0307	0.17±0.0149
20	255.20±39.512	-12.72±13.2455	0.84±0.0499	98.10±18.7830	115.64±18.2482	0.46±0.0400	0.18±0.0257

表 7 大黄鱼片在 0℃ 贮藏过程中 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 含量与肉质指标的相关系数

Tab.7 The Correlation coefficients of mRNA level of *Cathepsin L* gene and fillets quality traits of *P. crocea* during cold storage at 0℃

基因	时间	基因	pH	H	A	S	C	G	Co	R
时间										
基因	-0.996									
pH	0.984	-0.986								
H	-0.903	0.892	-0.946							
A	0.317	-0.294	0.335	-0.235						
S	-0.873	0.840	-0.889	0.963	-0.316					
C	-0.873	0.862	-0.902	0.975	-0.026	0.935				
G	-0.792	0.796	-0.819	0.893	0.219	0.811	0.965			
Co	0.365	-0.324	0.389	-0.367	0.961	-0.484	-0.176	0.087		
R	-0.385	0.426	-0.440	0.521	0.632	0.339	0.648	0.818	0.571	
L	0.120	-0.130	0.037	-0.044	-0.847	-0.008	-0.255	-0.456	-0.805	-0.633

性。宰杀后大黄鱼的 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 水平很大程度上受冷藏时间的影响, 与 Genciana 等(2011)研究海鲈鱼(sea bass)宰杀后 5d 内组织蛋白酶 L 基因的 mRNA 的稳定性结果较一致。可能的原因是大黄鱼宰杀后, 一方面 ATP 的储存量快速下降, 导致 RNA 的降解, 另一方面是由于鱼肉中本身的核糖核酸酶从细菌或者其他来源获得的外生核糖核酸酶源有助于 RNA 的降解比较缓慢, 具有一定的相对稳定性。

### 3.2 大黄鱼鱼片储藏期间 pH 与 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 水平的关联性

鱼肉 pH 主要与鱼的品种、季节、食物以及宰杀过程中鱼挣扎的强度以及鱼体上测定部位不同等因素有关。由表 5 可以看出, 随冷藏时间的延长, 宰杀后的大黄鱼背部肌肉的 pH 呈快速上升的趋势, 该规律类似于 Ocan-Higuera 等(2009)对卡松鱼的研究结果。Siriporn 等(2007)指出其可能原因是随着储藏时间的延长, 鱼肉新鲜度下降, 蛋白质被分解, 产生像氨和三甲胺等挥发性盐基组成化合物, 这些物质多为碱性, 最终导致鱼肉的 pH 上升。

分析 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 含量与肉质性状指标的相关系数, 由表 7 可以看出 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 含量和 pH 之间达到了高度负相关性( $r = -0.986$ )。这说明大黄鱼宰杀后冷藏期间 pH 的变化在很大程度上反映了 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 含量的变化, 从分子水平验证了 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 含量, 可以作为评价储藏期间鱼肉品质变化的可行性。

### 3.3 大黄鱼鱼片储藏期间 TPA 指标与 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 水平的关联性

Ruiz 等(2003)指出质构水平(TPA)可较好反映鱼肉的质地结构差异, 可作为评价鱼肉质构特性的客观量化指标。通过 SPSS 软件单因素方差分析大黄鱼鱼片储藏期间 TPA 参数与 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 水平的相关性(表 7), 结果表明 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 水平与硬度、弹性、胶粘性、咀嚼性相关系数  $r$  分别是 0.892、0.840、0.862、0.796。研究结果证实随储藏时间的延长, 大黄鱼肌肉中 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 含量水平不断下降, 与 TPA 参数显示为高度正相关性, 从组织水平说明通过 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 含量反映了储藏期间鱼肉品质变化的客观准确性。

### 3.4 大黄鱼肌肉 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 稳定性的潜在价值

目前, 关于鱼类肉质性状的研究主要是分析其

死后的嫩度、感官评价等方面, 或是研究活体上的基因对肉质性状的影响。而本研究从分子水平研究大黄鱼宰杀后在冷藏期间 *Cathepsin L* 基因 mRNA 的相对稳定性, 为研究评定冷藏期间鱼肉品质特征提供了新的思路和方向。

因此, 利用大黄鱼宰杀后冷藏期间的 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 水平, 并与相应常规肉质性状如 TPA、pH 等指标进行结合分析, 从分子水平、组织水平和理化水平等不同的层次评价鱼肉品质, 不仅避免了单一指标检测的片面性, 也从多水平不同角度更准确地阐释了大黄鱼在冷藏期间的肉质变化的内在机理, 使得常规的肉质指标结果更具可靠性, 分析结果更具科学性和准确性, 进一步说明 *Cathepsin L* 基因的 mRNA 水平可作为评定大黄鱼储藏期间肉质的重要指标。

## 参 考 文 献

- 马 宁, 陈晓汉, 曾地刚等, 2008. 凡纳滨对虾组织蛋白酶基因单核苷酸多态性的检测. 水利渔业, 7(4): 31—33
- 王彦波, 沈晓琴, 李学鹏等, 2010. 不同宰杀方式对鲫鱼肌肉质构和蛋白质组的影响. 中国食品学报, 10(6): 145—150
- 王志毅, 汪桂玲, 李家乐, 2011. 三角帆蚌组织蛋白酶 L 基因的克隆和序列特征与进化分析. 生物技术通报, 6: 104—110
- 李 娟, 李 莉, 张国范, 2011. 海湾扇贝组织蛋白酶 L 基因编码区的克隆和分析. 海洋通报, 30(3): 338—343
- 曾地刚, 陈晓汉, 彭 敏等, 2008. 用焦磷酸测序技术检测凡纳滨对虾组织蛋白酶基因单核苷酸多态性. 水产学报, 32(5): 684—689
- 鄢荣歆, 徐赛涛, 丛丽娜等, 2009. 海刺参组织蛋白酶 L 基因的克隆、重组表达及活性鉴定. 大连工业大学学报, 28(6): 391—396
- Carnevali O, Cionna C, Tosti L *et al*, 2008. Changes in cathepsin gene expression and relative enzymatic activity during gilt-head sea bream oogenesis. Molecular Reproduction and Development, 75(1): 97—104
- Chéret R, Delbarre-Ladrat C, de Lamballerie-Anton M *et al*, 2007. Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. Food Chemistry, 101: 1474—1479
- Delbarre-Ladrat C, Chéret R, Taylor R *et al*, 2006. Trends in postmortem aging in fish: Understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46(5): 409—421
- Genciana Terova, Elena Preziosa, 2011. Applying transcriptomics to better understand the molecular mechanisms underlying fish filet quality. Food Chemistry, 124: 1268—1276
- HUAQING LU, JUNZHUO XU, GERALDINE VANDER HAEGEN, 2008. Supplementing Marine Capture Fisheries in the East China Sea: Sea Ranching of Prawn *Penaeus ori-*

- entalis*, Restocking of Large Yellow Croaker *Pseudosciaena crocea*, and Cage Culture. *Reviews in Fisheries Science*, 16(1—3): 366—376
- Kwon J Y, Prat F, Randall C *et al*, 2001. Molecular characterization of putative yolk processing enzymes and their expression during oogenesis and embryogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction*, 65(6): 1701—1709
- Li J R, Lu H X, Zhu J L *et al*, 2009. Aquatic products processing industry in China: Challenges and outlook. *Trends in Food Science & Technology*, 20: 73—77
- Ocan-Higuera V M, Marquez-Ríos E, Canizales-Dávila M *et al*, 2009. Postmortem changes in cazon fish muscle stored on ice. *Food Chemistry*, 116: 933—938
- Ogata H, Aranishi F, Hara K *et al*, 1998. Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp *Cathepsin L*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 499—504
- Ruiz de Huidobro F, Miguel E, Onega E *et al*, 2003. Changes in meat quality characteristics of bovine meat during the first 6 days post mortem. *Meat Science*, 65(4): 1439—1446
- Seear P J, Sweeney G E, 2008. Stability of RNA isolated from post-mortem tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 34: 19—24
- Siriporn R, Soottawat B, Wonnop V *et al*, 2007. Effect of iced storage of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) on the chemical composition, properties and acceptability of Som-fug, a fermented Thai fish mince. *Food Chemistry*, 102(1): 270—280
- Tsunemoto K, Osatomi K, Nozaki Y *et al*, 2004. Molecular characterization of *Cathepsin L* from hepatopancreas of carp (*Cyprinus carpio*) comparative biochemistry and physiology. *B-Biochemistry and Molecular Biology*, 137B: 107—114
- Yeh H Y, Klesius P H, 2009. Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, cysteine proteinases: cloning, characterization and expression of cathepsin H and L. *Fish & Shellfish Immunology*, 26: 332—338

## STUDIES ON THE CLONING AND STABILITY OF cDNA FRAGMENTS OF *Cathepsin L* GENE IN *PSEUDOSCIAENA CROCEA*

ZHAO Jin<sup>1</sup>, GUO Ying-Jian<sup>1</sup>, LI Jian-Rong<sup>2,3</sup>, CUI Lin<sup>1</sup>, GE Jian<sup>1</sup>

(1. Zhejiang Marine Food Processing Quality Control Techniques and Instrumentation Engineering Laboratory, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou, 310018; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Food Safety, College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou, 310035; 3. Liaoning Provincial Key Laboratory of Food Safety, Bohai University, Jinzhou, 121013)

**Abstract** The cDNA fragments of *Cathepsin L* gene in *Pseudosciaena crocea* were amplified and quantified by RACE-PCR and RT-PCR. And the fragment length is 773bp. The analytical results of BLAST showed that the *Cathepsin L* gene in *P. crocea* have 95% homology with the gene in brown croaker and 80% homology in zebra fish. And the mRNA level of *Cathepsin L* gene was determined by RT-PCR in different cold storage period. The results showed that mRNA in muscle was relatively stable at 0°C during 0, 5, 10, 15, 20d. However, the mRNA levels were different and declining in different storage period. The highest level of mRNA were determined in 0d and varied significantly between 0d and other storage period ( $P<0.01$ ). Besides, the difference of mRNA levels between 5d, 15d and 20d were also obvious ( $P<0.01$ ). And mRNA level, TPA and pH values were highly correlated in different storage periods. Therefore, these results showed that mRNA level of *Cathepsin L* gene could be taken as an important evaluating indicator for *P. crocea* muscle in different cold storage period.

**Key words** *Pseudosciaena crocea*, Cold storage, *Cathepsin L*, mRNA stability, Evaluating indicator of muscle