

鳊肌酸激酶 M-CK cDNA 的克隆与组织表达分析

张敏, 赵金良*, 邓燕飞

(农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海海洋大学, 上海 201306)

摘要: 利用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增法 (RACE) 克隆了鳊 (*Siniperca chuatsi*) 肌酸激酶 (creatine kinase, CK) cDNA 序列, 并分析了该基因的结构特征和系统关系。鳊 CK cDNA 序列全长 1586 bp, 包括 5'端非翻译区 92 bp, 3'端非翻译区 348 bp 和开放阅读框 (ORF) 1146 bp, 共编码 381 个氨基酸。鳊 CK 具有脊椎动物 CK 共有的保守结构域和肌型肌酸激酶 (M-CK) 同工酶的特异识别位点; 氨基酸序列与 M-CK 型的相似度最高, 而与脑型肌酸激酶 (B-CK) 和线粒体型肌酸激酶 (Mi-CKs) 的相似度较低; 在 CK 系统关系树中鳊 CK 与 M-CK 群聚类。这些均表明, 鳊 CK 属脊椎动物 M-CK 型。RT-PCR 分析表明, 鳊 M-CK 在成体不同组织中的表达量不同, 其中, 在皮肤、卵巢、肾脏、胃、肌肉和心脏中表达较强; 而在眼和脑、肝胰脏中表达较弱。

关键词: 鳊; 肌酸激酶; cDNA 末端快速扩增; 组织表达

中图分类号: Q959.483.09; Q786 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2010)01-0077-07

Cloning and Tissue Expression Analysis of Creatine Kinase (M-CK) cDNA from the Mandarin Fish, *Siniperca chuatsi*

ZHANG Min, ZHAO Jin-Liang*, DENG Yan-Fei

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The creatine kinase (CK) cDNA from the mandarin fish *Siniperca chuatsi* was cloned by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods. The structural characteristics and phylogeny of this gene were analyzed. Sequence analysis revealed a 1586 bp cDNA sequence containing 92 bp 5'-untranslated region, 348 bp 3'-untranslated region and 1146 bp open reading frame (ORF), which encoded 381 amino acids. Conserved sequence blocks of vertebrate CKs and diagnostic boxes for the muscle CK (M-CK) isozyme were identified in *S. chuatsi* CK. *Siniperca chuatsi* CK showed a higher similarity with vertebrates M-CK isozyme than other CK isozymes (Brain CK, Mitochondrial CKs) and grouped with M-CK isozyme in CK phylogeny, which strongly supported that *S. chuatsi* CK belongs to M-CK isozyme type. Semi-quantitative RT-PCR analysis demonstrated that the M-CK transcript expression varied among the different tissues and was detected at a high level in skin, ovary, kidney, stomach, muscle and heart, but lower in eye, brain and liver.

Key words: *Siniperca chuatsi*; Creatine kinase; Rapid amplification of cDNA ends; Tissue expression

肌酸激酶 (creatine kinase, CK, EC 2.7.3.2) 能够催化磷酸基在二磷酸腺苷 ADP 和磷酸肌酸间的可逆性转移, 在心脏和肌肉等组织的能量代谢中起重要作用, 广泛分布于脊椎动物和无脊椎动物 (Watts et al, 1971; Abraham et al, 2002)。脊椎动物肌酸激酶存在胞质型 (cytosolic form) 和线粒体

型 (mitochondrial form) 两大类型 (Mühlebach et al, 1994)。胞质型肌酸激酶有 2 种形式: 肌型肌酸激酶 (M-CK) 和脑型肌酸激酶 (B-CK)。胞质型肌酸激酶以二聚体形式存在, 组成了 MM、MB 和 BB 三种异构体。MM 型主要存在于骨骼肌, BB 型主要存在于脑中, MB 型在不同物种的平滑肌和心肌中所

收稿日期: 2009-05-18; 接受日期: 2009-09-22

基金项目: 上海市科委基础研究重点项目 (09JC1406900); 江苏省农业科技攻关项目 (BE2007329); 上海海洋大学博士启动基金 (07274); 上海市教委项目 (05KZ02); 上海市重点学科建设项目 (Y1101) 资助

*通讯作者 (Corresponding author), E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

第一作者简介: 张敏 (1983 -), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物遗传育种, E-mail: zmyjjzmyjj@163.com

占的比例存在差异。线粒体型肌酸激酶同工酶也有2种：普遍存在于线粒体膜间隙的Miu-CK (ubiquitous Mi-CK) 和存在于肌节的Mis-CK (sarcomeric Mi-CK)。CK同工酶的种类具有明显物种特异性, 如环节动物有2种 (cyt-CK和Mi-CK), 日本七鳃鳗有2种 (M1-CK和M2-CK), 斑马鱼有3种 (M1-CK、M2-CK和B-CK), 小鼠有3种CK同工酶 (M-CK、B-CK和Miu-CK) (Matsushima et al, 2006)。尽管肌酸激酶同工酶类型多样, 具有特异的识别序列位点, 但其结构相对保守, 均含有6个高度保守的结构区域, 所有CK异构体都能可逆地催化ATP的 γ -磷酸基团转移到肌酸的胍基上生成ADP和磷酸肌酸 (Mühlebach et al, 1994)。

鳊 (*Siniperca chuatsi*) 是我国传统名贵淡水经济鱼类, 具有个体大、生长快、肉质鲜嫩、少刺的特点, 享有“淡水石斑鱼”的美誉。鱼类为变温动物, 鳊适温范围较广, 自北到南分布于东亚河流, 并被用于奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aurea*) 耐低温的遗传改良试验 (Yu et al, 2003)。鱼类CK在能量代谢中的作用是否与恒温动物相似; 在适应环境温度变化和完成各种生理活动中的调控机制如何都尚不明了。本实验通过RACE技术克隆了鳊肌酸激酶M-CK的cDNA序列, 并对其组织表达特征进行了初步分析, 以期为鱼类能量代谢与调控研究奠定分子基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鳊购于上海市浦东新区果园农贸市场, 体重0.56 kg。

总RNA抽提试剂TaKaRa RNAiso Reagent、RT-PCR试剂盒TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0、pMD19-T载体系统购自宝生物工程(大连)有限公司; BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 购于BD Biosciences; DNA Ladder、Loading Buffer、普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、大肠杆菌DH5 α 购自天根生物有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 肌肉总RNA的提取 活体解剖, 取肌肉100 mg于1.5 mL离心管中, 加入1 mL RNAiso reagent试剂, 经匀浆、氯仿抽提、异丙醇沉淀、75%酒精洗涤, 用适量0.01% DEPC处理过的水溶解总RNA。变性琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整

性。

1.2.2 引物设计与合成 根据GenBank中已报道鱼类的肌酸激酶基因序列, 运用Primer Premier 5.0结合Dnastar分析软件及BLAST程序, 设计肌酸激酶3'端的基因特异性引物P₁ (5'-CAAGTGTGACTGTGTGGCTGCG-3'), 参考3'端序列, 设计肌酸激酶5'端的基因特异性引物P₂ (5'-GACCTCGTAGGACTCCTCATCACCAGCG-3')。根据获得的肌酸激酶全长序列, 在第3和第6外显子上分别设计半定量RT-PCR引物P₃ (5'-CTGCGTCGCTGGTGTGAG-3')和P₄ (5'-TGTTGTCGTTGTGCCAGATG-3')。用于半定量RT-PCR内标 β -actin的引物为P₅ (5'-ATCGCCGCACTGGTTGTTGAC-3')和P₆ (5'-CCTGTTGGCTTTGGGGTTC-3')。所用引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2.3 RT及RACE扩增 肌肉总RNA的反转录和RACE扩增按照BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒的说明书进行。主要步骤如下: 在10 μ L的反应体系中, 取1 μ g总RNA为模板, 采用引物3'-CDS primer A和反转录酶BD PowerScriptTM Reverse Transcriptase合成3'-RACE-Ready cDNA。RT反应产物用200 μ L Tricine-EDTA Buffer稀释后, 取稀释液2.5 μ L为模板, 采用聚合50 \times Advantage 2 Polymerase Mix, 通用引物UPM和P₃进行3' RACE扩增。PCR反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 3 min, 5个循环; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 70 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 3 min, 5个循环; 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 68 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 3 min, 25个循环; 最后4 $^{\circ}$ C保存。以引物5'-CDS Primer A和SMART II A Oligo-nucleotide反转录5'-RACE-Ready cDNA, 再通用引物UPM和P₄进行5' RACE扩增, 反应条件同3' RACE。

1.2.4 PCR产物克隆测序及生物信息学分析 RACE产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测, 用普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒进行纯化, 纯化后的RACE产物与pMD19-T载体连接构建重组质粒, 转化感受态大肠杆菌DH5 α , 经LB平板(含Amp⁺、IPTG和X-gal)培养后, 筛选重组子进行插入片段检测, 序列测定由上海英骏生物技术有限公司完成。

应用Edit Seq程序进行开放阅读框(ORF)分析并推导相应的氨基酸序列, BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行序列同源性分析, Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>)

进行多序列比对, EMBOSS (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>) 进行序列相似度分析。应用MEGA 4.1构建NJ系统进化树。

1.2.5 RT-PCR分析CK在不同组织中的表达特征
皮肤、卵巢、肾脏、眼、肝胰脏、胃、肌肉、心脏、脑共9个组织的总RNA的提取同前, 起始浓度平衡后按TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0试剂盒说明书反转录。以各组织的反转录产物为模板, P₃和P₄为引物进行PCR扩增。PCR反应体系为25 μL, PCR反应程序为: 94℃, 3 min; 94℃, 30 s, 58℃, 30 s, 72℃, 45 s, 30个循环; 72℃延伸10 min。以

P₅和P₆为引物, PCR扩增β-actin作为检测基因表达的内标。取4 μL RT-PCR产物, 琼脂糖凝胶上电泳检测并拍照。

2 结 果

2.1 鳊肌酸激酶 cDNA 序列及氨基酸序列

以特异引物P₁和通用引物UPM进行3' RACE扩增, 在1200~1400 bp间获得一条明显的与预期大小相符的目的带(图1A); 同样以特异引物P₂和通用引物UPM进行5' RACE扩增, 获得一条约400 bp目的带(图1B)。

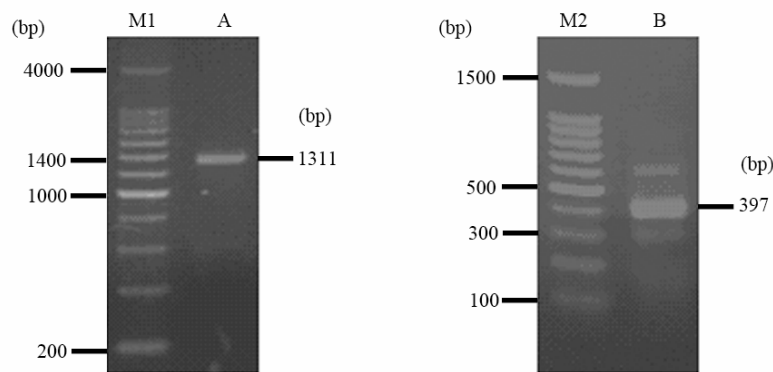


图 1 鳊肌酸激酶 3' RACE 和 5' RACE 扩增结果

Fig. 1 3' RACE and 5' RACE product of *Siniperca chuatsi* creatine kinase

M1: 200 bp 分子量标记; M2: 100 bp 分子量标记; A: 3' RACE 扩增产物; B: 5' RACE 扩增产物。

M1: 200 bp molecular marker; M2: 100 bp molecular marker; A: 3'RACE product; B: 5'RACE product.

3' RACE 和 5' RACE 产物分别经纯化、克隆、测序后拼接, 获得了鳊肌酸激酶基因 cDNA 序列(图2)。该基因 cDNA 全长 1586 bp, 包括 92 bp 的 5'端非翻译区, 348 bp 的 3'端非翻译区和 1146 bp 的阅读框, 共编码 381 个氨基酸残基, 3' UTR 区含有典型的加尾信号序列 ATTTAAA 和 PolyA 尾, 该序列已提交 GenBank (序列号: FJ613633)。

氨基酸序列组成分析表明, 鳊肌酸激酶具有脊椎动物肌酸激酶共有的 6 个高度保守的结构域。其中, 结构域 4 区含有绝对保守、高度活性的 Cys-283 和腺苷酸结合功能域 (LGXGXXGXV), 结构域 3 区包含肌酸激酶特有的 Lys-196。在肌酸激酶同工酶 (M-CK、B-CK、Miu-CK 和 Mis-CK) 的 9 个特异性多肽段位点上, 鳊肌酸激酶均表现与脊椎动物肌型 M-CK 高度一致 (Mühlebach et al, 1994)。

氨基酸序列同源性分析表明, 鳊肌酸激酶与其他脊椎动物 M-CK 的相似度范围: 91.9%~97.4%,

与 B-CK 的相似度范围: 88.2%~89.5%, 而与 Mis-CK、Miu-CK 的相似度范围: 68.4%~69.3%(表 1)。

基于氨基酸序列构建了脊椎动物 CK 的系统关系树(图 3)。脊椎动物 4 种肌酸激酶 (M-CK、B-CK、Miu-CK 和 Mis-CK) 分别聚类, 在 M-CK 分支中, 鳊与其他鱼类 M-CK 聚为一支, 鱼类、鸟类与哺乳类的系统关系与传统分类地位一致。

2.2 肌酸激酶 mRNA 在成体各组织中表达

以P₃和P₄为引物, RT-PCR检测发现鳊肌酸激酶在各组织中均扩增出一条 450 bp左右的特异片段。其中, 在皮肤、卵巢、肾脏、胃、肌肉和心脏中表达较强, 在眼、脑和肝胰脏中表达较弱(图 4)。

3 讨 论

本实验运用 RACE 法首次获得了鳊肌酸激酶 CK 长 1586 bp 的 cDNA 全序列, 共编码 381 个氨

表 1 鳊与其他脊椎动物 CK 氨基酸序列相似度比较
 Tab. 1 Amino acid sequence similarities of CK isozymes between *Siniperca chuatsi* and other vertebrates

类型 Type	登录号 GenBank accession No.	相似度 Similarity (%)
<i>Danio rerio</i> M-CK	CAM16434.1	97.40
<i>Oreochromis mossambicus</i> M1-CK	AAK56447.1	97.10
<i>Osmerus mordax</i> M-CK	ACO08856.1	97.10
<i>Cyprinus carpio</i> M2-CK	AAC96093.1	96.90
<i>Cyprinus carpio</i> M1-CK	AAC96092.1	96.60
<i>Oreochromis mossambicus</i> M2-CK	AAK56448.1	95.30
<i>Cyprinus carpio</i> M3-CK	AAC96094.1	94.00
<i>Danio rerio</i> M3-CK	AAP84632.1	94.00
<i>Homo sapiens</i> M-CK	AAH07462.1	93.70
<i>Rattus norvegicus</i> M-CK	NP_036662.1	93.40
<i>Gallus gallus</i> M-CK	NP_990838.1	91.90
<i>Gallus gallus</i> B-CK	NP_990641.1	89.50
<i>Homo sapiens</i> B-CK	CAA33389.1	89.50
<i>Mus musculus</i> B-CK	NP_067248.1	89.00
<i>Osmerus mordax</i> B-CK	ACO08855.1	89.00
<i>Oncorhynchus mykiss</i> B-CK	ACL80077.1	88.20
<i>Salmo salar</i> B-CK	NP_001133250.1	88.20
<i>Homo sapiens</i> Mis-CK	EAW95867.1	69.30
<i>Homo sapiens</i> Miu-CK	AAP35274.1	68.90
<i>Mus musculus</i> Mis-CK	NP_940807.1	68.80
<i>Gallus gallus</i> Miu-CK	P70079.1	68.40
<i>Mus musculus</i> Miu-CK	NP_034027.1	68.40
<i>Gallus gallus</i> Mis-CK	XP_424899.1	68.40

氨基酸。氨基酸序列分析表明, 鳊 CK 不仅具有脊椎动物 CK 共有的 6 个高度保守的结构域, 并且在 9 个 CK 同工酶特异识别位点上表现与 M-CK 型高度一致。氨基酸序列同源性分析表明该基因与其他脊椎动物 M-CK 型的相似度最高 (91.9%~97.4%), 而与脊椎动物 B-CK、Miu-CK 和 Mis-CK 型的相似度相对较低。此外, 在脊椎动物 CK 分子系统关系树中, M-CK、B-CK、Miu-CK 和 Mis-CK 分别聚类, 鳊 CK 与其他鱼类 M-CK 聚为一支。因此, 我们将本实验克隆的鳊 CK 定名为肌型肌酸激酶(M-CK)。

同工酶研究资料表明, 真骨鱼类中共有 4 种肌酸激酶同工酶 (CK-A、B、C、D), 且全部属于胞质型。其中, CK-A、C、D 分别主要在斜纹肌、胃、精巢组织中表达, CK-B 为普遍表达或仅在神经组织中表达 (Fisher et al, 1978)。但对编码肌酸激酶同工酶的确切基因数尚不明了。就 M-CK 而言, 哺乳动物和鸟类中只有 1 种 M-CK (Mühlebach et al, 1994), 真骨鱼类中蓝太阳鱼 *Lepomis cyanellus*

(Fisher et al, 1979)、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* (Shi et al, 2003) 中现只分离 1 种 M-CK cDNA, 鲨鱼 *Ginglymostoma cirratum* (Gray et al, 1986) 和电鳐 *Torpedo nobiliana* (West et al, 1984) 也只有 1 种 M-CK; 而在鲶鱼 *Ictalurus punctatus* 中发现有 2 种不同的 M-CK cDNA, 其中 M1 编码 381 个氨基酸, 有 3 种不同的等位基因; M2 编码 380 个氨基酸, 其核苷酸序列与 M1 的相似度为 86% (Liu et al, 2001)。在北极黑鳍冰鱼 *Chaenocephalus aceratus* 白肌中也发现 2 种不同 M-CK cDNA, 氨基酸序列相似度为 92% (Paul et al, 2003)。在鲤 *Cyprinus carpio* 肌肉文库中则获得了 3 种不同的 M-CK cDNA, 这 3 种 M-CK 均主要在肌肉中表达, 在心脏中微弱表达, 在脑、肾、鳃和肝脏中未见表达 (Sun et al, 2002)。这种多基因现象被推测与基因

```

-92                                     gggcgaccctattttgct
gtggtgaacaggatctgatcccaaggactgttacctctattcttctgtctgggtgagctgttagaagcaatc
1  ATGCCTTTCGGAAACACCCACAACAACCTTCAAGCTCAACTACAAAGTTGAGGAGGAGTCCCCGACCTGTCC
   M P F G N T H N N F K L N Y K V E E E F P D L S
   A B
73  AAGCACAACAACCATATGGCCAAGGTCCTGACCAAGGAGATCTATGCCAAGCTGAGGACAAGCAGACACCC
   K H N N H M A K V L T K E I Y A K L R D K Q T P
145 AGTGGCTACACCTTGGATGATGTCATCCAGACTGGTGTGACAACCCCGTACCCCTTCATCATGACTGTT
   S G Y T L D D V I Q T G V D N P G H P F I M T V
   C I
217 GGCTGCGTCGCTGGTGTGAGGAGTCTACGAGGTCTTCAAGGATCTGCTGGACCCATCATCTCCGACCGT
   G C V A G D E E S Y E V F K D L L D P I I S D R
289 CATGGTGATACAAGCCACTGACAAGCACAAGACCACCTGAAGTTCGAGAACCTGAAGGGTGGTGACGAC
   H G G Y K P T D K H K T D L N F E N L K G G D D
   D
361 CTGGACCCCAACTATGTTCTGTCCAGCGCGTTCGTAAGGATTACCCCTGCCCC
   L D P N Y V L S S R V R T G R S I K G F T L P P
   2
433 CACAACAGCCGTGGCGAGCGCAGAGCTATTGAGAAGCTGTCCGTTGAGGCTTGACGAGCCTGGACGGCGAG
   H N S R G E R R A I E K L S V E A L T S L D G E
   E
505 TTCAAGGAAAAGTACTACCCCTGAAGTCCATGACTGATGCCGAGCAGGAGCAGCTGATCAGTATCATCTTC
   F K G K Y Y P L K S M T D A E Q E Q L I S D H F
577 CTGTTTGACAAGCCCGTCTCCCTGCTGACCTGCGCCGGTATGGCCCGGACTGGCCTGACCCAGGGGC
   L F D K P V S P L L T C A G M A R D W P D A R G
   3 3
649 ATCTGGCACAACGACAACAAGACCTTCTGGTCTGGGTGAACGAGGAGGATCACCTGCGTGTATCTCCATG
   I W H N D N K T F L V W V N E E D H L R V I S M
   3
721 CAGCAGGGCGCAACATGAAGGAGGTCTTTAGGCGTTTCTGCGTGGCTGCAGAAGATTGAGGAGATCTTC
   Q Q G G N M K E V F R R F C V G L Q K I E E I F
   F
793 AAGAAGCACAACCACGGCTTCATGTGGAACGAGCATCTCGGCTACATCTGACCTGCCCTCCAACCTGGGT
   K K H N H G F M W N E H L G Y I L T C P S N L G
   4
865 ACCGGCTCGTGGTGGCGTCCACGTCAGCTGCCCAAGCTGAGCACACGCAAGTTGAGGAGATCCTC
   T G L R G G V H V K L P K L S T H A K F E E I L
   G
937 ACCAGGCTCGCTGTCAGAAGCGTGGCACAGGGGGTGGACACAGCCTCTGTTGGTGGTGTGGACATC
   T R L R L Q K R G T G G V D T A S V G G V L D I
   5
1009 TCCAACGCCACCGTCTGGGCTCCTCCGAGGTGGACCAGGTCCAGCTTGTGGTGTGATGGTCAAGCTGATG
   S N A D R L G S S E V D Q V Q L V V D G V K L M
   6
1081 GTTGAGATGGAGAAGAAGCTGGAGAAGGGTGAGCCATCGACAGCATGATCCCCGCCAGAAGTAA
   V E M E K K L E K G E A L D S M I P A Q K ★
   H I
1147 aaaggacaattttatgttttctcgtgaccattcatgtgcaatcgagccagctggcggtgtgcagaagaa
acagccgctcaccaagagactcttgactctgctcactctttttctcctccagctttttttctttctcc
gtcctttttttctcgttctccagtggttggttaacatcctgggatcagcctccactgagctgggctc
gcctggcagacgtggcatcacttctttgttataaaaagtaaatgattATTAAAgctgttcatactgctca
ataaaaagtgcacctgaaccaacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图2 鳊肌酸激酶 cDNA 和氨基酸序列

Fig. 2 The cDNA and deduced amino acid sequence of creatine kinase of *Siniperca chuatsi* creatine kinase

小写字母代表 3'、5'端非翻译区; 大写字母部分为编码区, 且上面为核苷酸序列, 下面为氨基酸序列, ★表示终止密码子; 多聚腺苷酸加尾信号 (ATTAAG) 用方框标出; 肌酸激酶的保守结构域用下划线 (1-6) 标出; 肌酸激酶同工酶特异识别位点用方框 (A-I) 标出。

3',5'-untranslated regions are shown as lowercases; Coding region is shown as uppercases, where the upper sequence indicates the nucleotide and the lower shows the amino acids; Asterisk indicates stop codon; Putative polyadenylation signals (ATTAAG) are boxed; The highly conserved region of CK framework are underlined (1-6); The diagnostic boxes of creatine kinase isozymes are marked with boxes (A-I).

复制或多倍体现象有关, 其进化与生理作用尚不清楚。

肌酸激酶不仅类型多样, 而且具有组织表达特

异性 (Liu et al, 2001; Graber et al, 2001)。已有研究表明, M-CK 主要在心肌的能量代谢中起重要作用 (Hammer et al, 2000)。本研究中, 鳊 M-CK 转

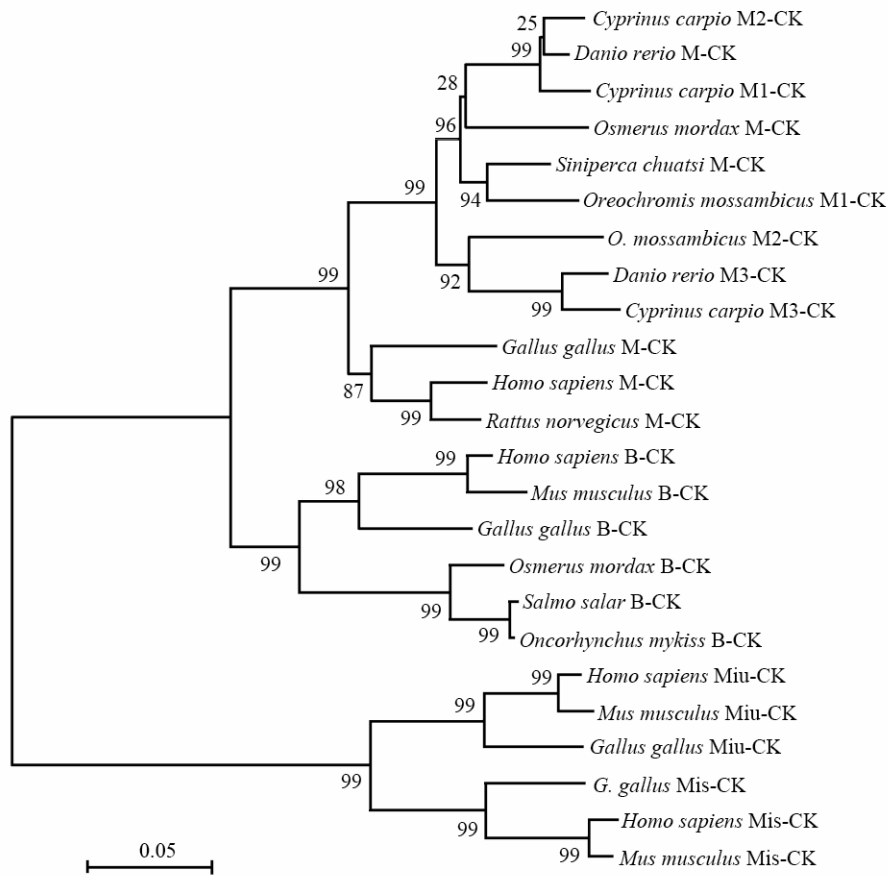


图 3 脊椎动物肌酸激酶的 NJ 系统关系树

Fig. 3 The NJ phylogenetic tree of vertebrate creatine kinase

分支节点的数值表示自引导值, 重复 1000 次(Nodal values represent percentage values of 1000 bootstrapping)。

鲤 M2-CK *Cyprinus carpio* M2-CK (AAC96093.1), 斑马鱼 M-CK *Danio rerio* M-CK (CAM16434.1), 鲤 M1-CK *Cyprinus carpio* M1-CK (AAC96092.1), 胡瓜鱼 M-CK *Osmerus mordax* M-CK (ACO08856.1), 鳊 M-CK *Siniperca chuatsi* M-CK (ACU11929.1), 莫桑比克罗非鱼 M1-CK *Oreochromis mossambicus* M1-CK (AAK56447.1), 莫桑比克罗非鱼 M2-CK *Oreochromis mossambicus* M2-CK (AAK56448.1), 斑马鱼 M3-CK *Danio rerio* M3-CK (AAP84632.1), 鲤 M3-CK *Cyprinus carpio* M3-CK (AAC96094.1), 红原鸡 M-CK *Gallus gallus* M-CK (NP_990838.1), 人 M-CK *Homo sapiens* M-CK (AAH07462.1), 褐家鼠 M-CK *Rattus norvegicus* M-CK (NP_036662.1), 人 B-CK *Homo sapiens* B-CK (CAA33389.1), 小鼠 B-CK *Mus musculus* B-CK (NP_067248.1), 红原鸡 B-CK *Gallus gallus* B-CK (NP_990641.1), 胡瓜鱼 B-CK *Osmerus mordax* B-CK (ACO08855.1), 大西洋鲑 B-CK *Salmo salar* B-CK (NP_001133250.1), 虹鳟 B-CK *Oncorhynchus mykiss* B-CK (ACL80077.1), 人 Miu-CK *Homo sapiens* Miu-CK (AAP35274.1), 小鼠 Miu-CK *Mus musculus* Miu-CK (NP_034027.1), 红原鸡 Miu-CK *Gallus gallus* Miu-CK (P70079.1), 红原鸡 Mis-CK *Gallus gallus* Mis-CK (XP_424899.1), 人 Mis-CK *Homo sapiens* Mis-CK (EAW95867.1), 小鼠 Mis-CK *Mus musculus* Mis-CK (NP_940807.1)。

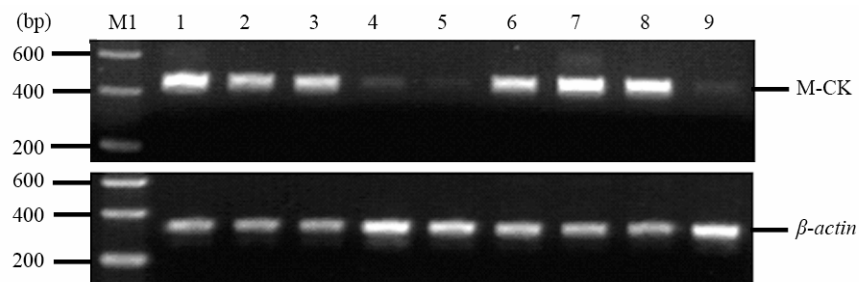


图 4 鳊肌酸激酶组织表达 RT-PCR 分析

Fig. 4 RT-PCR analysis of creatine kinase gene expression in various tissues from *Siniperca chuatsi*

M1: 200 bp 分子量标记; 1: 皮肤; 2: 卵巢; 3: 肾脏; 4: 眼; 5: 肝胰脏; 6: 胃; 7: 肌肉; 8: 心脏; 9: 脑。
M1: 200 bp molecular marker; 1: Skin; 2: Ovary; 3: Kidney; 4: Eye; 5: Liver; 6: Stomach; 7: Muscle; 8: Heart; 9: Brain.

录本在肌肉、心脏、皮肤、卵巢、肾脏、胃组织中均有表达,表明M-CK参与了这些组织中的能量代谢,可能是PCr/ATP平衡的主要调控者。在眼、肝胰脏和脑中M-CK表达微弱,可能与该组织能量代

谢水平较低相关,或该组织中的能量代谢由其他类型同工酶参与作用,此前已证实在神经组织(脑)中通常以BB型同工酶产物为主要存在形式(Mühlebach et al, 1994)。

参考文献:

- Abraham MR, Selivanov VA, Hodgson DM, Pucar D, Zingman LV, Wieringa B, Dzeja PP, Alekseev AE, Terzic A. 2002. Coupling of cell energetics with membrane metabolic sensing: Integrative signaling through creatine kinase phosphotransfer disrupted by M-CK gene knock-out[J]. *J Biol Chem*, **277**(27): 24427-24434.
- Batista e Silva CM, Nunes-Tavares N, Giovanni-De-Simone S, Nery da Matta A, Hassón-Voloch A. 2000. Purification and partial characterization of creatine kinase from electric organ of *Electrophorus electricus* (L)[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, **32**: 427-433.
- Fisher SE, Whitt GS. 1978. Evolution of isozyme loci and their differential tissue expression[J]. *J Mol Evol*, **12**: 25-55.
- Fisher SE, Whitt GS. 1979. Purification of the creatine kinase isozymes of the green sunfish (*Lepomis cyanellus*) with blue Sepharose CL-6B[J]. *Anal Biochem*, **94**: 89-95.
- Graber NA, Ellington WR. 2001. Gene duplication events producing muscle (M) and brain (B) isoforms of cytoplasmic creatine kinase: cDNA and deduced amino acid sequences from two lower chordates[J]. *Mol Biol Evol*, **18**(7): 1305-1314.
- Gray KA, Grossman SH, Summers DD. 1986. Purification and characterization of creatine kinase isozymes from the nurse shark *Ginglymostoma cirratum*[J]. *Comp Biochem Physiol : Part B*, **83**: 613-620.
- Hammer S, Bell M, Büchler N, Wahn H, Remkes H, Lohse MJ, Neubauer S. 2000. Acute changes of myocardial creatine kinase gene expression under L-adrenergic stimulation[J]. *Biochem Biophys Acta*, **1502**: 471-480.
- Harder G, McGowan R. 2001. Isolation and characterization of the muscle-specific isoform of creatine kinase from the zebrafish, *Danio rerio*[J]. *Biochem Cell Biol*, **79**: 779-782.
- Liu Z, Kim S, Kucuktas H, Karsi A. 2001. Multiple isoforms of an unusual cathodic isoform of creatine kinase from channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. *Gene*, **275**: 207-215.
- Matsushima K, Uda K, Ishida K, Kokufuta C, Iwasaki N, Suzuki T. 2006. Comparison of kinetic constants of creatine kinase isoforms[J]. *Int J Biol Macromol*, **38**(2): 83-88.
- Mühlebach SM, Gross M, Wirz T, Wallimann T, Perriad JC, Wyss M. 1994. IV-2 Sequence homology and structure predictions of the creatine kinase isoenzymes[J]. *Mol Cell Biochem*, **133/134**: 245-262.
- Paul W, Cashon RE, Bruce DS, Michael EV. 2003. Isolation, characterization and nucleotide sequence of the muscle isoforms of creatine kinase from the Antarctic teleost, *Chaenocephalus aceratus*[J]. *Comp Biochem Physiol Part B*, **134**: 651-667.
- Petrova TA, Shamova OV, Lyzlova SN. 1988. Comparative enzymatic analysis of creatine kinases from skeletal muscles of the cod, frog and rabbit[J]. *Zh Evol Biokhim Fiziol*, **24**: 489-496.
- Shi YH, Liu J, Xia JH, Gui JF. 2003. Cloning and expression characterization of creatine kinase M3-CK in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Acta Zool Sin*, **49**(5): 637-645. [石耀华, 刘 军, 夏建红, 桂建芳. 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.]
- Sun HW, Liu CW, Hui CF, Wu JL. 2002. The carp muscle-specific subisoenzymes of creatine kinase form distinct dimers under different temperatures[J]. *Biochem J*, **368**: 799-808.
- Watts DC. 1971. Evolution of phosphagen kinases[M]// Schoffeniels E, ed. *Biochemical Evolution and the Origin of Life*. Amsterdam: North-Holland, 150-173.
- West BL, Babbitt PC, Mendez B, Baxter JD. 1984. Creatine kinase protein sequence encoded by a cDNA made from *Torpedo californica* electric organ mRNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**: 7007-7011.
- Yu JH, Xia DQ, Yang H, He YH, Wu TT. 2003. Morphology of the progenies of *Oreochromis aurea* (♀)×*Siniperca chuatsi* (♂) [J]. *J Fish Chn*, **27**(5): 431-435. [俞菊华, 夏德全, 杨 弘, 贺艳辉, 吴婷婷. 2003. 奥利亚罗非鱼(♀)×鳊(♂)杂交后代的形态. *水产学报*, **27**(5): 431-435.]