



鳊鱼肌肉组织 重要功能基因研究

Study on the Important Muscle Functional Genes of
the Chinese Perch

褚武英 张建社 著



科学出版社

鳊鱼肌肉组织重要功能基因研究

褚武英 张建社 著

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书是我国在鱼类肌肉生长分化调控领域第一部专著,全面系统地介绍了鳊鱼肌肉生长发育调控机制。本书共分十一章:第一章系统地分析了鳊鱼不同品种间肌肉营养组成成分及肌纤维分型与特点;第二章到第五章研究了鳊鱼三类重要肌肉结构基因特点与表达特征;第六章到第十章分析了鳊鱼7个重要调控基因的特点与功能;第十一章分析了鳊鱼肌肉小RNA表达特点与功能分析。

本书可供从事鱼类生物学研究、水产养殖和水产品加工等工作的科研、技术人员阅读,也可作为高校和科研院所相关学科师生教学和科研参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

鳊鱼肌肉组织重要功能基因研究/褚武英, 张建社著. —北京: 科学出版社, 2017.2

ISBN 978-7-03-051658-9

I. ①鳊… II. ①褚… ②张… III. ①鳊鱼-肌肉组织-基因-研究
IV. ①S965.127 ②Q959.483

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 020940 号

责任编辑: 岳漫宇 / 责任校对: 刘亚琦
责任印制: 张 伟 / 封面设计: 北京图阅盛世文化传媒有限公司

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017年2月第一版 开本: B5(720×1000)

2017年2月第一次印刷 印张: 11 1/2

字数: 232 000

定价: 98.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

鱼类肌肉组织既是鱼类躯干的结构组织，又是人类重要的蛋白源。因此，以经济鱼类为主要养殖对象的水产养殖，实质上就是在适宜的生态条件下，采用综合优化养殖技术最大限度地促进鱼类肌细胞增殖和增大，达到提高养殖经济效益的目的。目前鱼类肌细胞分化和肌肉生长调控分子机制研究已成为鱼类发育生物学、营养学和高效养殖领域的研究热点之一。

鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) 属鲈形目，鲈科，鳊属。鳊鱼是原产于我国各主要江河湖泊的名贵食用鱼。鳊鱼味道鲜美，肉质细嫩，营养价值高，深受广大消费者欢迎。20 世纪 80 年代鳊鱼人工繁殖成功并进行大规模推广养殖，使之成为我国主要名贵养殖鱼类之一。目前我国鳊鱼养殖年产量超过 20 万吨，其产值每年在 100 亿元人民币以上，而且近几年价格稳中有升，人工养殖经济效益较大，其现已成为水产品市场中重要中高档产品。近年来，本课题组对鳊鱼优良肉质性状的理化特征和肌肉相关功能基因的克隆与功能分析进行了较系统研究。本书聚焦本课题组已经分析研究的鳊鱼肌肉相关功能基因，对其特点和功能做了较为详尽的描述。本书共分十一章：第一章系统地分析了鳊鱼不同品种间肌肉营养成分及肌纤维分型与特点；第二章到第五章研究了鳊鱼三类重要肌肉结构基因的特点与表达特征；第六章到第十章分析了鳊鱼 7 个重要调控基因的特点与功能；第十一章分析了鳊鱼肌肉小 RNA 的特点与功能。本书可供从事鱼类生物学研究、水产养殖和水产品加工等工作的科研、技术人员阅读，也可作为高校和科研院所相关学科师生的教学和科研参考用书。

衷心感谢本课题组所有老师和学生的辛勤努力，科学出版社参与本书出版的工作人员的支持与帮助，国家自然科学基金项目的连续资助，使我们的研究工作顺利进行。本书的出版得到“生物化学与分子生物学”湖南省重点建设学科和长沙学院出版基金项目支助，在此一并致谢。

由于作者水平有限，书中难免有疏漏和不妥之处，敬请读者批评指正。

褚武英 张建社

2016 年 11 月

目 录

前言

第一章 鳊鱼肉品质分析与比较	1
第一节 鳊鱼肌肉营养成分分析与比较	1
一、三种鳊鱼肌肉基本营养成分分析与比较	1
二、三种鳊鱼脂肪酸组成及含量比较	2
三、翘嘴鳊与鲢鱼氨基酸组成及含量比较	2
第二节 翘嘴鳊肌纤维类型与特点	2
一、翘嘴鳊背肌石蜡切片 HE 染色初步分型与分析	2
二、翘嘴鳊成体背肌酶组化染色分型研究	4
参考文献	8
第二章 翘嘴鳊肌球蛋白轻链基因的克隆与表达分析	10
第一节 翘嘴鳊三个肌球蛋白轻链基因的克隆与序列分析	10
一、翘嘴鳊 <i>MLC1</i> 、 <i>MLC3</i> 基因核苷酸序列及其氨基酸序列分析	10
二、翘嘴鳊 <i>MLC2</i> 基因 cDNA 的克隆及序列分析	14
第二节 翘嘴鳊 <i>MLC1</i> 、 <i>MLC2</i> 、 <i>MLC3</i> 基因发育性表达分析	16
一、翘嘴鳊 <i>MLC1</i> 和 <i>MLC3</i> 基因发育性表达分析	16
二、翘嘴鳊 <i>MLC2</i> 基因发育性表达分析	16
参考文献	18
第三章 斑鳊肌球蛋白轻链基因的克隆与表达分析	20
第一节 斑鳊三个肌球蛋白轻链基因的克隆与序列分析	20
一、斑鳊 <i>MLC1</i> 、 <i>MLC3</i> 基因核苷酸序列及其氨基酸序列分析	20
二、斑鳊 <i>MLC2</i> 基因 cDNA 的克隆及序列分析	26
第二节 斑鳊 <i>MLC1</i> 、 <i>MLC2</i> 、 <i>MLC3</i> 基因表达分析	29
一、斑鳊 <i>MLC</i> 基因早期发育性表达分析	29
二、斑鳊 <i>MLC</i> 在背部白肌中的纵向表达分析	32
参考文献	33
第四章 翘嘴鳊肌球蛋白重链基因的克隆与表达分析	36
第一节 翘嘴鳊红肌 <i>MyHC1</i> 基因的克隆与序列分析	36

一、翘嘴鳊红肌 <i>MyHC1</i> 基因核苷酸序列及其氨基酸序列分析	36
二、翘嘴鳊 <i>sMyHC1</i> 基因在红肌、白肌和心肌中表达量比较与分析	42
第二节 翘嘴鳊白肌 <i>MyHC1</i> 基因原核表达及其多克隆抗体制备	45
一、翘嘴鳊白肌 <i>MyHC1</i> 基因片段克隆结果与分析	45
二、翘嘴鳊白肌 <i>MyHC1</i> 基因原核表达及优化检测	46
三、融合蛋白表达形式	48
四、Western-Blot 检测	48
五、间接 ELISA 对抗体效价的测定	48
参考文献	50
第五章 翘嘴鳊小清蛋白基因的克隆及其原核表达分析	53
第一节 翘嘴鳊小清蛋白基因的克隆及序列分析	53
一、翘嘴鳊小清蛋白基因核苷酸序列及其氨基酸序列分析	53
二、翘嘴鳊小清蛋白基因 DNA 的序列分析	61
第二节 翘嘴鳊小清蛋白原核表达	64
一、翘嘴鳊小清蛋白重组表达载体构建	64
二、翘嘴鳊小清蛋白原核表达及优化检测	65
参考文献	68
第六章 翘嘴鳊生肌调节因子 <i>MyoD</i> 和 <i>MyoG</i> 基因的克隆及其发育表达分析	70
第一节 翘嘴鳊生肌调节因子 <i>MyoD</i> 和 <i>MyoG</i> 基因的克隆及序列分析	70
一、翘嘴鳊 <i>MyoD</i> 基因核苷酸序列及其氨基酸序列分析	70
二、翘嘴鳊 <i>MyoG</i> 基因的克隆及序列分析	76
第二节 翘嘴鳊生肌调节因子 <i>MyoD</i> 和 <i>MyoG</i> 的早期发育表达分析	83
一、翘嘴鳊胚胎时期 <i>MyoD</i> 基因的表达情况	83
二、翘嘴鳊胚胎时期 <i>MyoG</i> 基因的表达情况	84
参考文献	85
第七章 翘嘴鳊生肌调节因子 <i>MRF4</i> 和 <i>Myf5</i> 基因的克隆及表达研究	88
第一节 翘嘴鳊生肌调节因子 <i>MRF4</i> 和 <i>Myf5</i> 基因的克隆及序列分析	88
一、翘嘴鳊 <i>MRF4</i> 和 <i>Myf5</i> 基因核苷酸序列及其氨基酸序列分析	88
二、翘嘴鳊 <i>Myf5</i> 基因 cDNA 的克隆及序列分析	94
三、翘嘴鳊 <i>MRF4</i> 和 <i>Myf5</i> 基因的系统进化分析	100
第二节 翘嘴鳊 <i>MRF4</i> 、 <i>Myf5</i> 基因的时空表达分析	102
一、生肌调节因子在翘嘴鳊不同组织器官中的表达差异	102
二、生肌调节因子在翘嘴鳊胚胎不同发育时期的表达差异	103

三、生肌调节因子在翘嘴鲌胚后发育阶段的表达差异	103
第三节 短期饥饿对生肌调节因子表达的影响	106
一、短期饥饿后持续投喂对翘嘴鲌生肌调节因子表达的影响	107
二、短期饥饿后饱食一餐对翘嘴鲌 4 种生肌调节因子的表达分析	107
参考文献	110
第八章 斑鳊 <i>Myostatin</i> 基因的克隆及其表达分析	114
第一节 斑鳊 <i>Myostatin</i> 基因及其启动子的克隆与序列分析	114
一、斑鳊 <i>Myostatin</i> 基因序列分析	114
二、斑鳊 <i>Myostatin</i> 基因启动子序列分析	114
三、斑鳊 <i>Myostatin</i> 基因内含子序列分析	120
四、斑鳊 <i>Myostatin</i> 基因编码氨基酸的二级结构及高级结构分析	122
五、斑鳊 <i>Myostatin</i> 的遗传和进化分析	122
六、斑鳊 <i>Myostatin</i> 的进化分析	123
第二节 <i>Myostatin</i> 的发育与表达	126
一、斑鳊 <i>Myostatin</i> 的组织特异性表达分析	126
二、斑鳊 <i>Myostatin</i> 基因胚胎早期发育的表达分析	127
参考文献	128
第九章 翘嘴鲌 <i>FSRP1</i> 基因的克隆及其表达分析	130
第一节 翘嘴鲌 <i>FSRP1</i> 基因的克隆及其表达分析	130
一、翘嘴鲌 <i>FSRP1</i> 基因核苷酸序列及其氨基酸序列分析	130
二、翘嘴鲌 <i>FSRP1</i> 基因的时空表达分析	135
三、短期饥饿再投喂对翘嘴鲌 <i>FSRP1</i> 基因表达的影响	136
第二节 翘嘴鲌 <i>FSRP1</i> 基因的原核表达分析	137
一、翘嘴鲌 <i>FSRP1</i> 基因重组表达载体的构建	137
二、翘嘴鲌 <i>FSRP1</i> 基因的原核表达及 SDS-PAGE 检测分析	139
参考文献	141
第十章 翘嘴鲌 <i>FSRP3</i> 基因的克隆及其表达分析	143
第一节 翘嘴鲌 <i>FSRP3</i> 基因的克隆及其表达分析	143
一、翘嘴鲌 <i>FSRP3</i> 基因核苷酸序列及其氨基酸序列分析	143
二、翘嘴鲌 <i>FSRP3</i> 基因的时空表达分析	147
第二节 翘嘴鲌 <i>FSRP3</i> 融合蛋白对肌纤维增殖和分化的影响	149
一、翘嘴鲌 <i>FSRP3</i> 融合蛋白对肌纤维直径的影响	149
二、翘嘴鲌 <i>FSRP3</i> 融合蛋白对肌卫星细胞增殖与分化的影响	149

参考文献.....154

第十一章 翘嘴鳊骨骼肌 miRNA 的表达分析及其对肌肉调控的初步研究.....156

第一节 翘嘴鳊白肌小 RNA 文库的构建及分析.....157

一、鳊鱼白肌小 RNA 文库的构建.....157

二、翘嘴鳊骨骼肌 miRNA 的鉴定.....159

第二节 翘嘴鳊骨骼肌 miRNA 的表达分析.....161

第三节 饥饿再投喂对骨骼肌 miRNA 表达的影响.....166

第四节 miR-181a-5p 与 *Myostatin* 基因的靶向验证.....169

参考文献.....172

第一章 鳊鱼肉品质分析与比较

鳊鱼因其味道鲜美和肉质细嫩等优良肉质性状已成为我国水产养殖业中重要的名贵养殖鱼类之一。目前我国鳊鱼养殖年产量超过 20 万吨，其产值每年在 100 亿元人民币以上，而且近几年其价格稳中有升，人工养殖经济效益较大，现已成为水产品市场中重要的中高档产品^[1]。鳊类属鲈形目（Perciformes）、鳊亚科（Sinipercinae），鳊类一共有 11 个品种（翘嘴鳊、斑鳊、大眼鳊、暗鳊、波纹鳊、高体鳊、柳州鳊、日本少鳞鳊、中国少鳞鳊、朝鲜少鳞鳊和无斑鳊）。鳊属鱼类资源非常丰富，但目前真正被利用的只有翘嘴鳊、大眼鳊、斑鳊，尤其是翘嘴鳊生长快、产量高、味道鲜美，被广泛人工繁殖并大量养殖^[2]。其他种类基于其生长速度比较缓慢和繁殖率低等因素降低了养殖者的经济效益，故并未作为主要养殖对象开发利用。

本课题组系统地分析了鳊鱼不同品种间肌肉营养成分、氨基酸和脂肪酸组成模式及肌纤维分型。系列研究结果阐明了鳊鱼味道鲜美主要是与其肌肉的高鲜味氨基酸（谷氨酸和天冬氨酸等）含量直接相关；肉质细嫩的分子基础主要与鳊鱼肌纤维密度高、直径小相关。相关研究结果为对鳊鱼品质、营养价值的初步评价和饲养营养需求研究提供了必要的基础数据，更有利于鳊鱼的大规模人工养殖生产。

第一节 鳊鱼肌肉营养成分分析与比较

一、三种鳊鱼肌肉基本营养成分分析与比较

含肉率的高低决定了鱼肉可食部分的比例，也是评价其食用价值、鱼类品质、经济性状和生产性能的重要指标之一^[3]。含肉率因鱼类品种、生活环境、饵料、食性、饲养管理技术不同而存在差异^[4-7]。本试验对翘嘴鳊、大眼鳊和斑鳊这三种鳊鱼的含肉率进行测定，其中斑鳊含肉率最高，为 43.40%，其次是翘嘴鳊，为 40.30%，大眼鳊最低，为 40.27%。结果表明鳊鱼不同品种间含肉率存在一定差异。大眼鳊与斑鳊的水分含量分别比翘嘴鳊低 5.37 个百分点和 5.27 个百分点，比鲢鱼低 6.04 个百分点和 5.94 个百分点（表 1-1）。大眼鳊和斑鳊的水分含量与其他已报道的经济鱼类相比仅高于黄鳝（75.69%）和鲮鱼（72.0%）。蛋白质含量测定结果显示大眼鳊与斑鳊均高于翘嘴鳊，大眼鳊蛋白质含量比鲢鱼蛋白质含量高 1.7%。鳊鱼具有含肉率高、肌肉蛋白质含量高、脂肪含量低、水分少及干物质量大等特点。蛋白质和脂肪含量标志着鱼类的营养水平，因此鳊鱼是一种具有很高营养价值的鱼类。

表 1-1 三种鳊鱼肌肉基本营养成分的含量 (%)

种类	水分	蛋白质	脂肪	灰分	含肉率
翘嘴鳊	81.43	15.11	2.18	5.37	40.30
大眼鳊	76.06	16.71	1.10	5.33	40.27
斑鳊	76.16	16.09	1.62	5.45	43.40
鲢鱼	82.10	15.01	5.25	5.28	40.01

二、三种鳊鱼脂肪酸组成及含量比较

翘嘴鳊、斑鳊、大眼鳊、鲢鱼这 4 种鱼都含有的饱和脂肪酸为 $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ ；单不饱和脂肪酸为 $C_{16:1}$ 、 $C_{18:1}$ ；多不饱和脂肪酸为 $C_{18:2}$ 、 $C_{20:5}$ 、 $C_{22:6}$ 。斑鳊、大眼鳊、翘嘴鳊饱和脂肪酸含量依次为 24.40%、29.29%、35.75%；不饱和脂肪酸含量依次为 71.96%、67.82%、54.88%。鲢鱼检测出不饱和脂肪酸仅含 42.05%，远低于三种鳊鱼。

三、翘嘴鳊与鲢鱼氨基酸组成及含量比较

翘嘴鳊肌肉组织中必需氨基酸和鲜味氨基酸含量均高于鲢鱼，其必需氨基酸含量占氨基酸总量的 34.7%，必需氨基酸和非必需氨基酸含量之比为 1.03，超过推荐的理想食品蛋白质指标，鳊鱼肌肉含有极高的增鲜剂——谷氨酸和天冬氨酸（占总氨基酸含量的 28.8%），与鲢鱼肌肉相比，翘嘴鳊肌肉蛋白质整体偏酸，主要与其肌肉鲜味氨基酸（谷氨酸和天冬氨酸等）含量较高有关（图 1-1）。

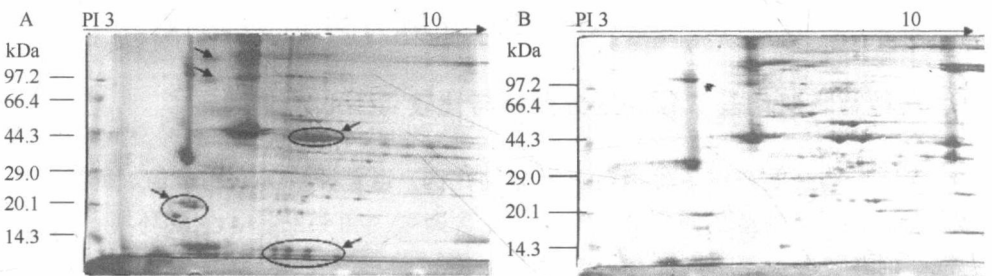


图 1-1 翘嘴鳊 (A) 和鲢鱼 (B) 肌肉蛋白质双向电泳图

第二节 翘嘴鳊肌纤维类型与特点

一、翘嘴鳊背肌石蜡切片 HE 染色初步分型与分析

肌肉组织块经固定、浸蜡包埋、切片脱蜡苏木精-伊红 (HE) 染色处理后，显微镜下观察到肌纤维细胞被染成深浅不一的红色（图 1-2）。其中皮肤下面紧贴

着的数层肌纤维细胞排列紧密，细胞周围较深层细胞圆润，用 Image-pro 6.0 软件测量出其直径较小；而深层的肌纤维细胞细胞间隙较大，相对于浅层肌细胞松散，且边界呈棱角多边形，用软件测量出其直径较大，但中间也夹杂着直径较小的细胞。前中后部肌肉的浅层肌含量及肌细胞的排列紧密度也不一样。其中浅层肌比例沿前、中、后部依次递增。

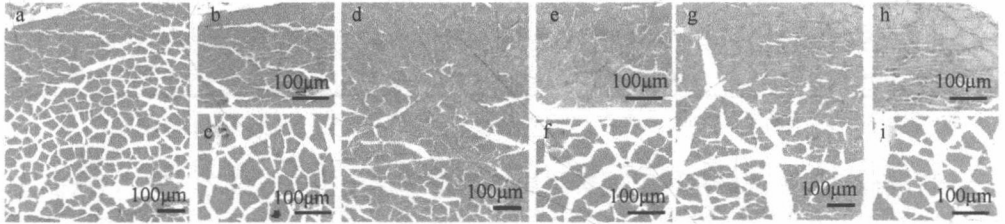


图 1-2 翘嘴鳊鱼肌前、中、后部石蜡切片 HE 染色（请扫描封底二维码查看彩色图片，全书同）
a, d, g 分别为前、中、后部背肌石蜡 HE 染色；b, e, h 分别为前、中、后部浅层肌的放大；
c, f, i 分别为前、中、后部深层肌的放大

用 Image pro 6.0 软件按图片浅层肌和深层肌纤维不同直径范围大小的百分比进行数据统计，然后用 SPSS16.0 软件对数据进行单因素方差分析，结果发现在浅层肌（表 1-2）中，直径在 $0\sim 15\mu\text{m}$ 内的纤维所占比例前、中、后部两两均具有显著性差异 ($P<0.05$)，其中后部显著高于中部，中部显著高于前部；直径大小在 $15\sim 30\mu\text{m}$ 内后部均显著高于前部和中部 ($P<0.05$)，而前部和中部之间无显著性差异；当直径大小在 $30\sim 45\mu\text{m}$ 内时，中部肌肉比例显著高于后部 ($P<0.05$)，而前中、前后两两间均无显著性差异；肌纤维直径大小大于 $45\mu\text{m}$ 时，前、中、后部两两间均具有显著性差异 ($P<0.05$)，前、中、后部三者依次显著高于后者。

表 1-2 翘嘴鳊浅层肌前、中、后部各直径范围肌纤维构成比例

直径范围/ μm	肌纤维构成比例 (Mean \pm SD)		
	前部	中部	后部
$0<d\leq 15$	3.37 \pm 0.45 ^a	5.14 \pm 0.30 ^b	7.10 \pm 0.26 ^c
$15<d\leq 30$	64.36 \pm 2.11 ^a	64.20 \pm 1.70 ^a	71.43 \pm 2.15 ^b
$30<d\leq 45$	21.50 \pm 1.44 ^{ab}	24.83 \pm 2.92 ^a	19.77 \pm 2.01 ^b
$45<d$	10.77 \pm 0.92 ^a	5.83 \pm 1.89 ^b	1.70 \pm 0.30 ^c

注：同行上标小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)

如表 1-3 所示，在深层肌中，直径大小范围为 $0\sim 40\mu\text{m}$ ，前、中、后部三者均具有显著性差异 ($P<0.05$)，其中后部显著高于前部，前部显著高于中部；而在 $40\sim 80\mu\text{m}$ 内，中部显著高于后部 ($P<0.05$)，而前中、前后两两之间不具有显著性差异；在 $80\sim 100\mu\text{m}$ 内，前、中、后部三者均具有显著性差异 ($P<0.05$)，其中前、中、后部三者依次显著高于后者；当直径大小大于 $100\mu\text{m}$ 时，前部和中部

所占比例很少, 均无显著性差异, 而后部未发现有直径大于 100 μm 细胞。

表 1-3 翘嘴鳊深层肌前、中、后部各直径范围肌纤维构成比例

直径范围/ μm	肌纤维构成比例 (Mean \pm SD)		
	前部	中部	后部
0< d \leq 40	35.33 \pm 2.42 ^a	29.47 \pm 1.1 ^b	39.77 \pm 1.01 ^c
40< d \leq 80	55.83 \pm 1.76 ^{ab}	64.10 \pm 0.9 ^a	58.23 \pm 1.14 ^b
80< d \leq 100	7.20 \pm 0.95 ^a	4.70 \pm 0.40 ^b	2.60 \pm 0.79 ^c
100< d	1.60 \pm 0.10	1.73 \pm 0.56	0.00

注: 同行上标小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)

制作石蜡切片是最常用的观察组织细胞形态学结构的方法之一^[8]。该法能完整保持细胞原有的形态结构且细胞之间界限清晰, 常与苏木精曙红 (HE) 染色法联用, 将细胞染成红色, 方便在显微镜下观察^[9]。由于该试验方法经典且在不同组织较为通用, 因此选择石蜡切片试验初步对鳊鱼肌纤维进行分型研究。观察结果大致可以将皮肤下的肌肉分为浅层肌和深层肌两种不同类型的肌纤维部分, 这与 Flood 报道的文昌鱼肌纤维分型研究结果一致^[10,11]。其中浅层肌与深层肌界限较为明显, 可以用肌细胞直径大小、肌纤维密度及肌纤维细胞形状加以区分。

两种肌纤维类型在鳊鱼前、中、后部的体现有差异。在浅层肌中, 直径范围在 15~30 μm 内的纤维占有明显优势, 其比例达到了 60% 以上, 而在 0~15 μm 内和大于 45 μm 的比例最低, 只占到 10% 左右, 直径大小在 30~45 μm 内的比例在 20% 以上。在深层肌中, 直径范围在 40~80 μm 内的具有优势, 其比例也在 60% 左右, 在 0~40 μm 内的小纤维占到了总体的 30% 以上, 而大于 80 μm 以上的大直径纤维只占不到 10%, 甚至在后部肌肉中没有观察到大于 100 μm 的超大型肌纤维细胞。出现这种情况, 很可能是因为鱼在水中游动时前、中、后部的肌肉负责的功能有所不同, 运动需要靠肌纤维的收缩提供能量^[12-14], 而不同直径大小的肌纤维收缩和舒张所依靠的不同类型的肌肉蛋白提供的张力也不一致, 正是由于不同大小及比例的肌纤维存在, 导致鱼类游行的方式多种多样^[15,16]。但以上只是从形态学初步对肌纤维进行分型, 其生化特征到底如何, 怎样得到更加细化的结果, 则有待后续试验进一步研究。

二、翘嘴鳊成体背肌酶组化染色分型研究

人和动物体内的各种化学反应都离不开酶的催化, 酶 (enzyme) 是生物体内一种具有催化特性的蛋白质, 存在于细胞的各个部位。组织细胞中含有酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、ATP 酶、胆碱酯酶、非特异性酯酶、琥珀酸脱氢酶、 γ -谷氨酰转肽酶等多种酶类。而各种酶由于其功能及作用方式的不同, 在组织化学当中能

有各种不同的指示作用。

我们主要选取了翘嘴鳊成体背中部肌肉的琥珀酸脱氢酶 (SDH 酶) 和肌球蛋白三磷酸腺苷酶 (mATPase) 进行染色分析。首先通过对线粒体内特定的酶——SDH 酶进行活性染色, 可以得知不同部位代谢能力的差异, 代谢能力的高低将直接决定肌肉肉质的好坏^[17]。其次构成肌纤维的主要蛋白质——肌球蛋白分子的 N 端包含一个 ATP 酶活力和肌动蛋白结合区域, 与两条重链结合被称为动力马达或亚基 I (S1), 为肌肉收缩水解 ATP 提供转换能量, 而肌球蛋白重链存在着多种亚型, 我们先通过 ATP 酶染色组化试验区验证不同亚型的 *MyHC* 与肌纤维类型的关系, 为之后的原位杂交深入研究奠定基础。

取翘嘴鳊背中部肌肉组织冰冻切片, 采用琥珀酸脱氢酶染色法孵育后显色, 其阳性反应产物分布于肌纤维细胞质中的线粒体上, 呈蓝紫色颗粒状或棒状。根据以往对哺乳动物肌纤维进行琥珀酸脱氢酶染色后能将骨骼肌肌纤维分成深染蓝紫色的红肌纤维 (即慢肌) 和染不上色的白肌纤维 (即快肌) 及浅染的粉肌 (即中间肌) 三种结果, 如图 1-3 所示, 可观察到细胞内有呈颗粒状、线粒体染成较深蓝紫色的红肌纤维细胞, 其排列紧密, 直径较小且呈椭圆形, 以及无法染上颜色、纤维直径较大、呈不规则多角状的白肌纤维细胞。

翘嘴鳊背肌组织切片在经过不同 pH 的酸碱环境孵育后, 由于红肌 I 型纤维 (即慢速氧化型) 的 ATP 酶是在酸环境条件下稳定而在碱环境条件下相反, 因此其在 pH4.3 和 pH4.6 预孵育处理后能染成黑色, 而在 pH9.4 和 pH9.6 预孵育处理后不着色或者呈浅灰色; 白肌纤维 IIa (快速氧化型) 与 IIb (快速酵解型) 在 pH4.3 预孵育处理后, 前者能染成黑色而后者不着色, 而在 pH9.4 预孵育处理后, 均能染上黑色, 但前者较后者染色程度要浅 (图 1-4)。

运用冰冻切片技术迅速冷冻组织细胞到一定硬度条件下, 然后进行快速连续切片, 能够很好地保证组织细胞酶的活性不被破坏, 但其很难避免在冷冻过程中出现冰晶而对细胞结构形态存在一些影响, 所以有研究表明对组织块进行蔗糖脱水过夜处理或者将组织块放入液氮中进行速冻能减少冰晶的产生^[18]。本研究试验了前者的方法, 冰晶是有减少, 但发现组织细胞酶活性受到一定影响, 从而着色浅, 对肌纤维分型造成影响。

酶组化技术需要对试验材料进行预处理固定, 保证细胞形态结果完整, 但 SDH 酶和 mATPase 对固定剂极其敏感、不耐受^[19], 所以有研究者采取缩短预固定时间或者降低固定液浓度的措施来避免。多次重复本试验发现, 采取先迅速孵育染色、后固定的方法既能保证不影响酶活性, 又能很好地保持细胞的结构完整。

琥珀酸脱氢酶位于细胞的能量工厂线粒体内, 其在三羧酸循环中占有十分重要的地位, 其活性能够准确反映出骨骼肌纤维内细胞的有氧呼吸功能, SDH 酶组化方法就是根据其氯化硝基四氮唑兰 (NBT) 结合后染色强度的不同来对肌纤

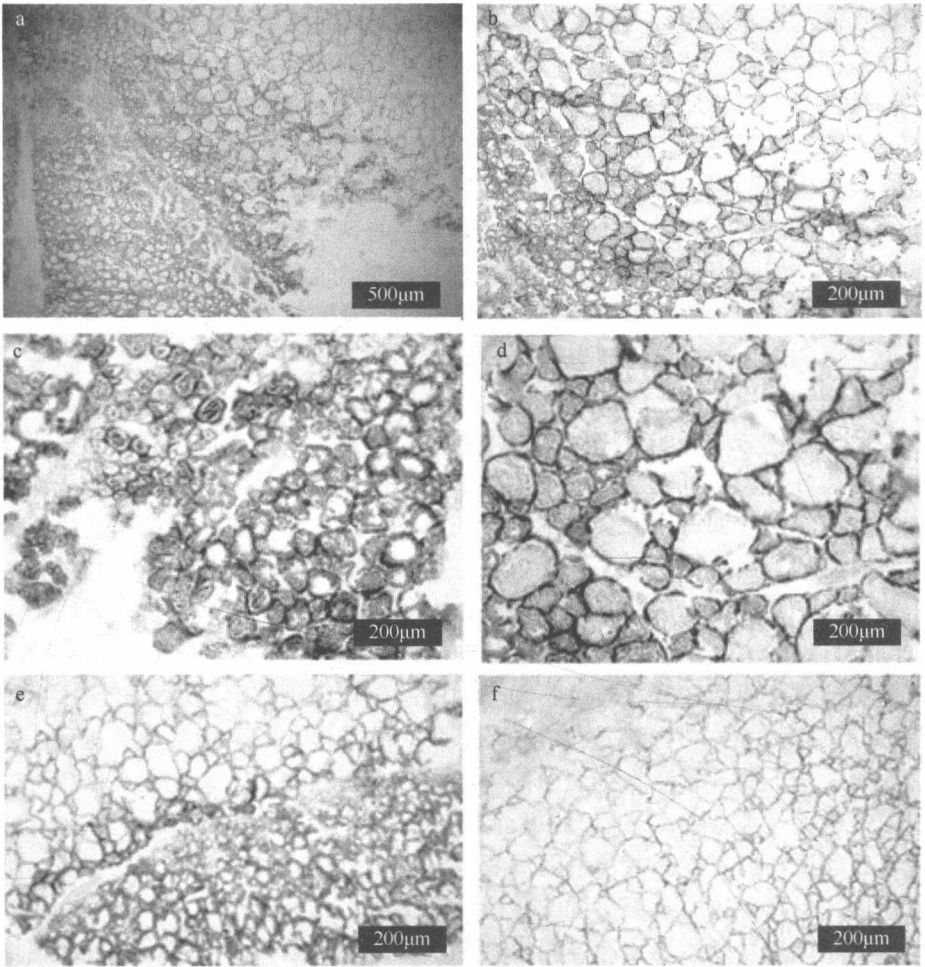


图 1-3 翘嘴鳊背肌中部纤维的琥珀酸脱氢酶组织化学染色图

a 为 SDH 酶整体；b 为 SDH 酶放大；c, d 为红肌和白肌的放大；e, f 为浅层红肌与深层白肌对比

维进行分型。琥珀酸脱氢酶染色法中孵育反应最为重要，其孵育液必须现配现用，不然会产生底物的非酶性分解，给分型造成误差，孵育时间也是关键，孵育时间过长或过短会导致肌细胞染色程度深浅不一，影响判断^[20]，本研究经多次重复试验研究表明孵育 40min 染色效果最好。

红肌纤维内富含线粒体，主要进行有氧呼吸，其收缩慢但持久，且不易疲劳，故又称为慢速氧化型纤维。而白肌正好相反，主要进行无氧酵解呼吸，其收缩快时间短，但容易疲劳，所以白肌又称快速酵解型纤维。有研究显示，红肌在快速游泳中起到主要作用^[14]，还有研究表明，加强活动量等有氧运动能够改变肌纤维类型所占比例^[21]。翘嘴鳊为食肉动物，在捕食时通常需要依靠尾部迅速游动来捕捉活物，故观察到鱼体尾部红肌比例明显高于前部和中部。

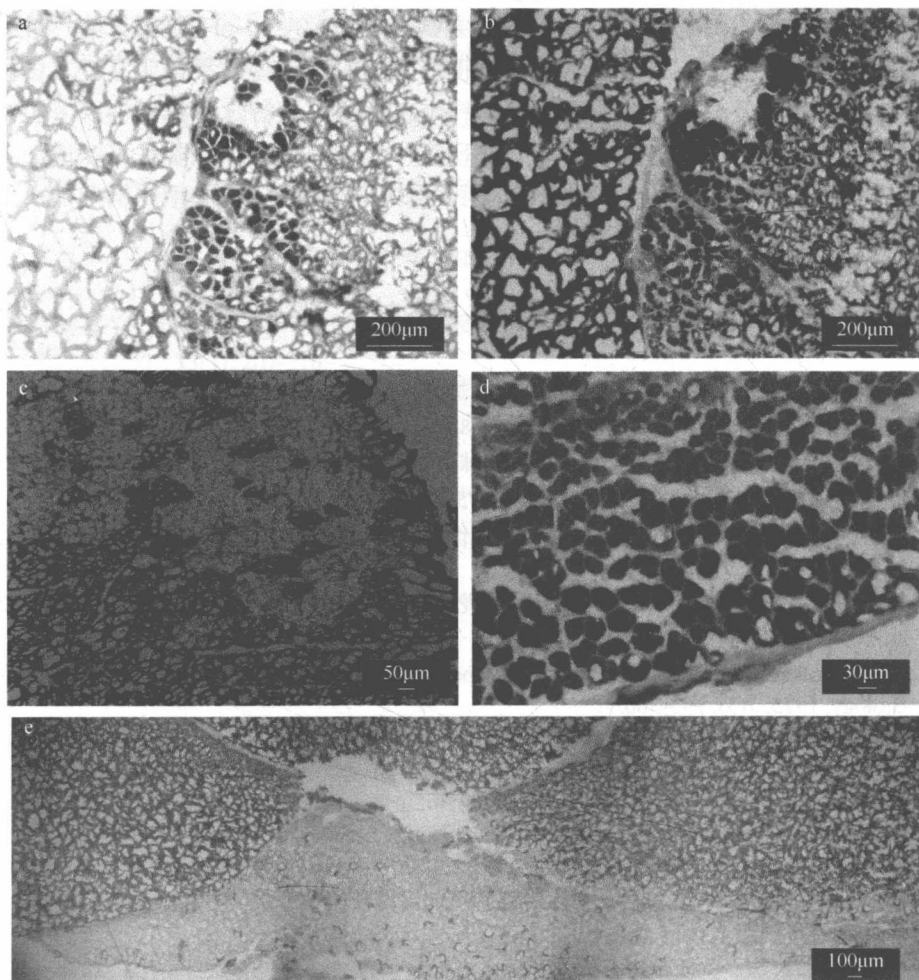


图 1-4 翘嘴鳊背肌中部 mATPase 组织化学染色

a, b 为酸碱孵育后快慢肌对比; c 为 pH4.3 下染黑的 I 型和 IIa 型; d 为 pH4.3 下染黑的 I 型纤维的放大; e 为 pH9.4 下浅深层快慢肌对比

肌球蛋白三磷酸腺苷酶 (mATPase) 主要存在于肌原纤维的头部, 其能水解 ATP, 为粗、细肌丝纤维收缩提供能量, 由于不同肌纤维具有不同 pH 活性的同工酶下染色的特性, 故选择不同 pH 条件预孵育, 从而对肌纤维进行分型研究。新鲜肌肉组织中的 ATP 酶在其最适酸碱条件下, 在钙离子的参与下, 催化底物 ATP 水解产生磷酸, 从而与钙离子结合生成磷酸钙, 钙离子再被钴离子置换形成磷酸钴, 最后磷酸根离子再被硫离子置换形成黑色的硫化钴沉淀, 便可以在显微镜下观察不同类型的肌纤维。pH 是 ATP 酶组化试验的关键所在。首先要保证溶液现配现用; 其次 pH 标准液要勤换, 每次调节之前都要对其进行标定; 最后不同物种之间的 ATP 酶的最适 pH 不同, 甚至有研究表明预孵育液 0.1 的 pH 差别都能对

分型结果造成很大影响^[22], 所以本试验尝试了多个梯度的 pH 预孵育液, 最终发现酸性预孵育液在 pH4.3、碱性预孵育液在 pH9.4 时分型效果最明显。本试验中区分出来的白肌 II a 型(快速氧化型)纤维在鱼类快速游泳中起到辅助慢肌快速氧化、提供能量的作用。董敏辉等^[21]在研究中表明, 有氧训练除了可以增加 I 型纤维的面积, 还有可能使 II b 型纤维向 II a 型转变, 从而使 II a 型比例增加, I 型纤维比例不变。

参 考 文 献

- [1] 农小献, 赵发兰, 宾石玉, 等. 斑鳊轻链 3 基因(*MLC3*)cDNA 的克隆及纵向表达分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2011, 34(2): 79-83.
- [2] 赵发兰, 周瑞雪, 成嘉, 等. 鳊鱼与鲢鱼肌球蛋白轻链 2 启动子的克隆及其序列比较分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2011, 34(1): 75-79.
- [3] 陈伟兴, 刘清振, 范兆廷, 等. 鱼类肉质评价及影响因素研究进展[J]. 肉类研究, 2012, 10: 34-40.
- [4] 李池陶, 关海红, 胡雪松, 等. 大头鲤、黑龙江鲤、德国镜鲤及其杂种 F₃ 肌肉品质的比较[J]. 水产学报, 2008, 32(1): 45-50.
- [5] Greek-Walker M, Pull G. A survey of red and white muscle in marine fish [J]. *Journal of Fish Biology*, 1975, 7(3): 295-300.
- [6] Kiessling A, Storebakken T, Åsgård T, et al. Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age: I. Growth dynamics [J]. *Aquaculture*, 1991, 93(4): 335-356.
- [7] Nag AC. Ultrastructure and adenosine triphosphatase activity of red and white muscle fibers of the caudal region of a fish, *Salmo gairdneri* [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1972, 55(1): 42-57.
- [8] 秦宁, 徐日福, 张树敏, 等. 长白山野猪和东北民猪骨骼肌组织学特性比较[J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(3): 343-347.
- [9] 刘希良. 翘嘴鳊肌纤维初步分型及其红肌 *MyHC1* 基因克隆、表达分析[D]. 桂林: 广西师范大学硕士学位论文.
- [10] Flood PR. Structure of the segmental trunk muscle in *Amphioxus* [J]. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 1967, 84(3): 389-416.
- [11] Flood PR. Fine structure of the notochord of *amphioxus* [J]. *Symp Zool Soc Lond*, 1975, 81-104.
- [12] Coughlin D, Rome L. Recruitment of pink and red muscle in swimming scup varies with temperature and swimming speed [J]. *Biol Bull*, 1999, 196: 145-152.
- [13] Maddock L, Bone Q, Rayner JM. The mechanics and physiology of animal swimming [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
- [14] Rome LC, Loughna PT, Goldspink G. Muscle fiber activity in carp as a function of swimming speed and muscle temperature [J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 1984, 247(2): R272-R279.
- [15] Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease [J]. *Physiological Reviews*, 2000, 80(3): 1215-1265.
- [16] Coughlin DJ. Aerobic muscle function during steady swimming in fish [J]. *Fish and Fisheries*, 2002, 3(2): 63-78.

- [17] Bowker B, Botrel C, Swartz D, et al. Influence of myosin heavy chain isoform expression and postmortem metabolism on the ATPase activity of muscle fibers [J]. Meat Science, 2004, 68(4): 587-594.
- [18] 袁永辉, 张韵风. 制作临床快速冰冻切片的质量控制[J]. 实用医技杂志, 2004, 11(6): 846-847.
- [19] 高美钦, 晋雯, 张文敏. 肌球蛋白三磷酸腺苷酶的染色技术[J]. 解剖学杂志, 2004, 27(1): 104-105.
- [20] 陈佩林, 朱道立. 骨骼肌琥珀酸脱氢酶的组织化学方法探讨[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(2): 10-11.
- [21] 董敏辉, 宋吉锐, 赵平, 等. 有氧运动对发育期大鼠骨骼肌肌纤维影响的研究[J]. 解剖科学进展, 2007, 13(3): 207-210.
- [22] 高云芳, 何志仙, 樊小力, 等. pH 对应用 mATP 酶法进行梭外肌纤维分型的影响[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2005, 35(1): 76-78.

(褚武英 张建社 刘希良 符贵红)