

低温胁迫对鲤红细胞膜表面结构的影响及相关基因分析

丁雷^{1,3}, 李勇^{1,3}, 李言^{1,3}, 常玉梅², 梁利群^{1,2,3}, 雷清泉²

(1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 哈尔滨理工大学, 黑龙江 哈尔滨 150080; 3. 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 以荷包红鲤(*Cyprinus carpio* var. *wananensis*) 耐寒品系(♂, 耐低温)与云南大头鲤(*Cyprinus pellegrini pellegrini* Tchang) (♀, 不耐低温)的杂交F₂为研究对象, 研究抑制消减杂交技术构建的鲤耐低温差异表达基因cDNA文库中2个具有多态性的新差异表达基因[克隆号为CC005 (GenBank_Accn为FF339846)和CC062 (GenBank_Accn为FF677502)]与低温下鲤红细胞膜形态之间关联性, 结果显示, 活力正常的实验鱼红细胞膜边缘有数个棘状凸起, 直径在500 nm左右, 高度为300 nm左右; 两个未知新基因CC005和CC062在膜表面结构凸起组和正常组(相对正常)之间基因型组合分布存在极显著差异($\chi^2=21.345$, $P<0.01$), 推测这2个与低温相关的基因对低温下鲤红细胞膜表面出现的凸起结构有协同效应, 这一实验结果将为鲤的耐低温机理研究和标记辅助选择育种提供理论依据。[中国水产科学, 2009, 16(4): 496–505]

关键词: 鲤; 低温; 红细胞膜; 差异表达基因

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)04-0496-10

研究鱼类对环境温度的适应性有助于在理论上阐明鱼类进化、自然选择等原理, 也可在实践中为鱼类遗传改良和定向培育新品种提供基础数据。近年来, 通过众多研究人员的不懈努力, 鱼类对环境适应的相关研究已经取得了长足的进展。Hazel^[1]发现, 当温度骤降时, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)体内脂肪生成过程中, 不饱和脂肪酸比例升高。冷驯化的虹鳟, 脂肪酸去饱和作用(尤其参与生成n-3/n-6家族的长链多不饱和脂肪酸PUFA)明显快于暖驯化的虹鳟。Dey等^[2]通过对海水和淡水鱼肝脏磷脂膜的分子结构研究发现, 冷驯化鱼类(5~10℃)比暖驯化鱼类(25~27℃)含有较高的多不饱和脂肪酸, 但长链多不饱和脂肪酸DHA似乎并不参与低温适应过程, 而单不饱和脂肪酸油酸(18:1)在低温条件下含量增高。Devries^[3]1969年在南极海峡一种鱼(Antarctic notothenioid)的血液中首次发现抗冻蛋白, 后经研

究发现, 多数极地鱼类和冷水鱼类都能产生抗冻蛋白或抗冻糖蛋白, 这些蛋白质能将鱼的体液冰点降至-2.2℃(海水的冰点约为-1.9℃), 从而使之在海水冰点之下仍能保持体液的流动性。

中国水产科学研究院黑龙江水产研究所自1996年开始研究鲤(*Cyprinus carpio*)的耐低温机理, 首次应用分子标记技术, 获得了9个与鲤耐低温性状相关的RAPD分子标记, 并将其中的1个标记定位在鲤鱼遗传连锁图谱上, 由此提出鲤的耐低温性状属于数量性状, 受多基因控制^[4]。梁利群等^[5]以荷包红鲤(*Cyprinus carpio* var. *wananensis*)抗寒品系和大头鲤(*Cyprinus pellegrini pellegrini* Tchang)的杂交F₂为研究对象, 获得低温差异表达基因序列, 在因特网上通过BLAST比对, 同源性较高的基因克隆中包括质膜钙转运腺苷三磷酸酶3、AMP-acid连接酶、斑马鱼跨膜蛋白、膜内在蛋白质GPR137B、跨膜蛋白50A、活性

收稿日期: 2008-09-15; 修订日期: 2009-01-08.

基金项目: 国家“973”计划资助项目(2004CB117404).

作者简介: 丁雷(1982-), 女, 硕士研究生, 从事分子生物学研究. E-mail: dinglei_1982@126.com

通讯作者: 梁利群. Tel: 0451-84861314; E-mail: lq-liang@hotmail.com

钙钾离子通道亚基 $\alpha 1$ 等,更有大量的未知基因序列。本实验根据已有的实验材料和取得的研究结果,利用原子力显微镜对低温下活力表现不同的实验鱼的红细胞膜结构进行观测,同时利用低温下特异表达的基因标记进行相关性分析,以期对与低温相关的功能基因的克隆鉴定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验鱼 实验鱼荷包红鲤耐寒品系(♂,耐低

温)与云南大头鲤(♀,不耐低温)的杂交 F_2 ,由中国水产科学研究院黑龙江水产研究所培育。从中随机选取体质量在200~250 g的健康鱼28尾进行实验。依次编号依此为1~28。

1.1.2 耐低温相关基因标记 低温差异表达基因序列是以温度为坐标、以所选实验鱼为研究对象,通过抑制消减杂交法获得。采用Primer 5.0和Oligo 6.0软件设计引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。通过筛选,其中CC005和CC062的扩增结果具多态性,引物详细信息见表1。

表1 引物序列及退火温度
Tab. 1 Primers' sequences and annealing temperature

引物 Primer	引物序列 5'~3' Primer sequence 5'~3'	片段长度 /bp Fragment size	退火温度 /℃ Annealing temperature
CC005	F: TGCACAAACACGAATGAATG R: CCGTTCATAATGTGCTGCTC	208	50
CC062	F: GCCGCCAACATTTTCTAA R: GTGGGCAGATTGTTGGACTT	194	54

1.2 实验方法

1.2.1 低温胁迫实验设计 降温实验模型是在Trueman等^[6]报道的基础上稍加修改而设计的。常玉梅等^[7]已对室内控温循环水族箱内的过滤养殖用水进行水质分析,各项指标基本符合养殖用水标准。将实验鱼做鳍条标记后,放入水温为 $(16.0 \pm 2.0)^\circ\text{C}$ 的室内控温循环水族箱,水族箱四周及敞口区用保温板密封。实验开始第1天将水温从 16.0°C 以 $1.0^\circ\text{C} \cdot \text{h}^{-1}$ 降至 10.0°C ,实验鱼在 $(10.0 \pm 2.0)^\circ\text{C}$ 进行驯化4 d后,再以 $1.0^\circ\text{C} \cdot \text{h}^{-1}$ 降温至 4.0°C 。在 $(4.0 \pm 2.0)^\circ\text{C}$ 维持1个月后进行各项测试。同时,观察记录在不同温度下实验鱼的活动状态。

1.2.2 红细胞膜原子力显微镜标本制备 以 $(4.0 \pm 2.0)^\circ\text{C}$ 冷驯化下的实验鱼作为实验样本,将注射器中吸入100 μL 枸橼酸钠,尾静脉采血1 mL,轻轻摇匀,避免凝血,低速离心(2 000 r/min,3 min),弃上清,然后用pH7.4等渗磷酸缓冲液反复洗涤、离心,直至上层澄清。将下层红细胞用等渗磷酸缓冲液10倍稀释,取10 μL 稀释液滴于直径为15 mm圆形载玻片

上,2.5%戊二醛固定,4 $^\circ\text{C}$ 下放置5 min。去离子水冲洗,干燥。

1.2.3 红细胞膜原子力显微结构观测 将制备好的标本置于原子力显微镜(简称AFM, NanoScope III a, Digital Instruments Inc.)载物台上,利用Nikon倒置显微镜观察细胞的分散情况,选择细胞分散无重叠区域进行单个细胞扫描。在操作软件中选择轻敲模式(Tapping mode),调整激光到针尖(型号:RTESP7)处,并将探测器的激光光斑置于中心圆点。在操作软件中选择自动调频,然后进行样品逼近操作,直至针尖接触到样本,开始扫描。对计算机显示屏上显示细胞的相应图像进行保存,并利用软件对所需参数进行测量、分析。每个样本制2张片,每张片扫描2~3个细胞,扫描顺序依次为单个红细胞、红细胞膜部分结构,扫描范围为 $2.8 \sim 14.0 \mu\text{m}$,扫描频率为2.01 Hz。

1.2.4 基因组DNA提取 取活体实验鱼鳍条每1 mg加入200 μL 裂解液(含200 $\mu\text{g/mL}$ Proteinase K, 200 $\mu\text{mol/L}$ EDTA和0.5% 十二烷基肌氨酸钠)后,50 $^\circ\text{C}$ 消化4~5 h,加入等体积饱和苯酚+氯仿+异戊

醇混合液(体积比25:24:1)400 μL 抽提,7 500 r/min,离心10 min,取上清液,再重复抽提2次;于上清液中加入2倍体积的预冷无水乙醇 -20°C 沉淀过夜,12 000 r/min,离心15 min,70%乙醇洗涤、干燥,加入50 μL 的TE(含10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),1 mmol/L EDTA (pH 8.0))溶解, 4°C 保存备用。

1.2.5 PCR扩增反应 PCR反应体系: 体积为15 μL , 含50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 1.5 mmol/mL MgCl_2 , 100 $\mu\text{g/mL}$ 明胶, 4种dNTP各100 $\mu\text{mol/mL}$, 0.1% Triton X-100, 0.1% NP-40, 正反引物终浓度为0.25 $\mu\text{mol/mL}$, Taq酶1 U (TAKARA, 日本), DNA模板30~50 ng。

反应程序: 94°C 预变性3 min; 26个循环(92°C 20 s, 退火20 s, 72°C 30 s); 延伸 72°C 10 min。

1.2.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳 PCR产物用8%聚丙烯酰胺凝胶电泳5~6 h(100 V)进行检测,银染,利用扫描仪成像。

1.3 数据处理与统计分析

采用直接计数法分别计算CC005和CC062两种基因扩增片段中出现的每种基因型的数量,等位基因及基因型频率,确定每种基因型在群体间的分布关系。用POPGENE 3.2 软件检验该实验组的基因组DNA在2个位点是否处于Hardy-Weinberg平衡状态。

其他统计分析用SPSS 13.0完成。采用卡方(χ^2)检验。

2 结果与分析

2.1 温度变化与鱼体反应

水温从 16.0°C 降到 10.0°C 时,实验鱼并未出现任何不良反应,游动自如,且群聚活动,在随后的4 d冷驯化中,表现亦正常。当水温继续从 10.0°C 降至 4.0°C 时,部分实验鱼开始出现游动缓慢,上浮,分散独游等现象,其中28号个体死亡(由于夜间死亡,其红细胞膜结构未测)。在随后维持的2个月后,另有21号和24号个体鱼体表面出现白斑(视为病鱼),其他实验鱼体表面光滑,2、6、10、11、12、13号个体活动正常,其他个体游动稍有缓慢。

2.2 低温下活动能力表现不同实验鱼的红细胞膜结构差异分析

图1显示,在 $14\ \mu\text{m} \times 14\ \mu\text{m}$ 扫描范围下,不同活力鲤红细胞多呈椭圆形,长径($12.057 \pm 1.293\ \mu\text{m}$),短径为($7.412 \pm 1.107\ \mu\text{m}$)。在不同的扫描范围下均可看出不同活动能力实验鱼红细胞膜表面结构存在差异: 活动能力正常的实验鱼红细胞膜边缘有数个棘状凸起,对多个细胞进行扫描,均有此现象。同时对低温下活动能力不同的鱼进行分组,分别测其长短径,结果显示: 活动能力正常的红细胞长径为($11.990 \pm 1.457\ \mu\text{m}$),短径为($7.225 \pm 1.158\ \mu\text{m}$); 活动缓慢组红细胞长径($11.938 \pm 0.969\ \mu\text{m}$),短径为($7.394 \pm 0.864\ \mu\text{m}$); 鱼体表面出现白斑(病鱼)实验鱼组红细胞长径为($12.860 \pm 1.080\ \mu\text{m}$),短径为($8.635 \pm 0.864\ \mu\text{m}$)。方差分析表明,各实验组之间长、短径均无显著差异($F_{\text{长}}=0.853, P>0.05; F_{\text{短}}=3.081, P>0.05$)。

图2为活动能力正常实验鱼红细胞膜表面单个凸起的超微形貌图(扫描范围为 $2.8\ \mu\text{m} \times 2.8\ \mu\text{m}$)和截面曲线图,对该凸起进行测量,直径在500 nm左右,高度为300 nm左右;当原子力显微镜扫描范围缩小时,可观察到低温下活动缓慢实验鱼红细胞膜表面存在细微结构,在 $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ 扫描范围下可以看到细胞膜表面分布着大小不等的颗粒,图3是对单个细胞进行超微扫描的形貌图及横截面曲线图。

2.3 PCR扩增产物聚丙烯酰胺凝胶检测

在利用低温下特异表达的基因引物CC005 和CC062 对低温下活动能力不同的实验鱼进行基因型分析发现,2个引物扩增结果中均存在3种基因型,2种纯合型和1种杂合型,CC005引物扩增出3种基因型,分别定义为AA、AB、BB型;CC062基因扩增的3种基因型,将其定义为MM、MN、NN型(图4、图5)。所观测的27尾实验鱼中个体2、6、10、11、12、13号在低温下活动能力正常,红细胞表面具有棘状凸起结构;21、24号个体为病鱼个体,本部分实验中未对其进行分析,其余19个个体在低温下游动缓慢,其红细胞膜表面结构相对于凸起结构来说视为正常。以下均将其简称为凸起组和正常组。

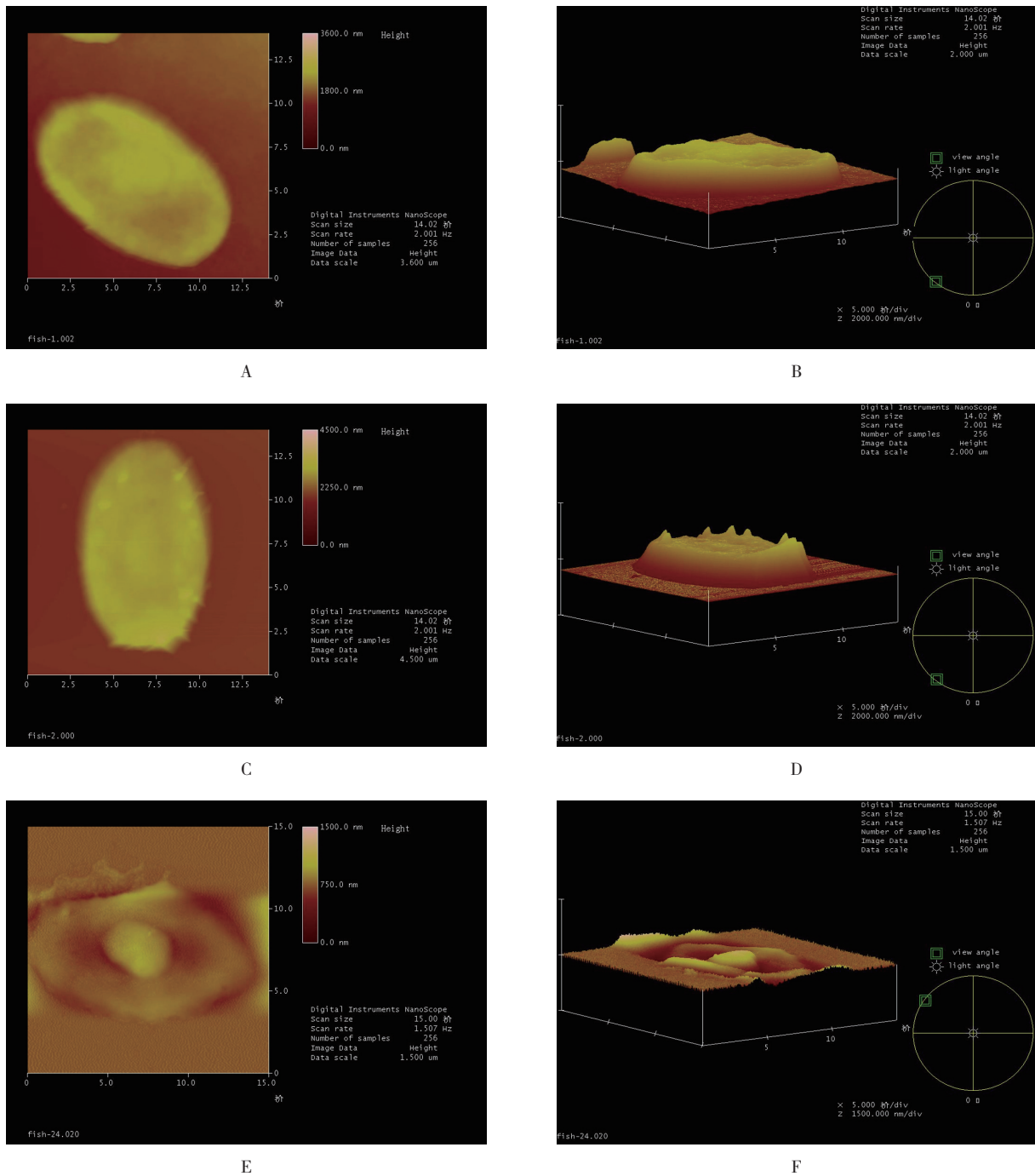


图1 AFM下不同活动能力鲤红细胞表面形貌图及三维立体图

A: 游动缓慢鱼红细胞表面图; B: 游动缓慢鱼红细胞立体图; C: 游动正常鱼红细胞表面图;
D: 游动正常鱼红细胞立体图; E: 疾病鱼红细胞表面图; F: 病鱼红细胞立体图。

扫描范围: A、B、C、D ($14\ \mu\text{m} \times 14\ \mu\text{m}$); E、F ($15\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$)。

Fig. 1 AFM images and three-dimensional map of different vigor fish erythrocyte

A: AFM images of erythrocyte of swimming slowly fish. B: Three-dimensional map of erythrocyte of swimming slowly fish. C: AFM images of erythrocyte of swimming actively fish. D: Three-dimensional map of erythrocyte of swimming actively fish. E: AFM images of erythrocyte of the ill fish. F: Three-dimensional map of erythrocyte of the ill fish.

Scanning range: A, B, C, D ($14\ \mu\text{m} \times 14\ \mu\text{m}$); E, F ($15\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$)。

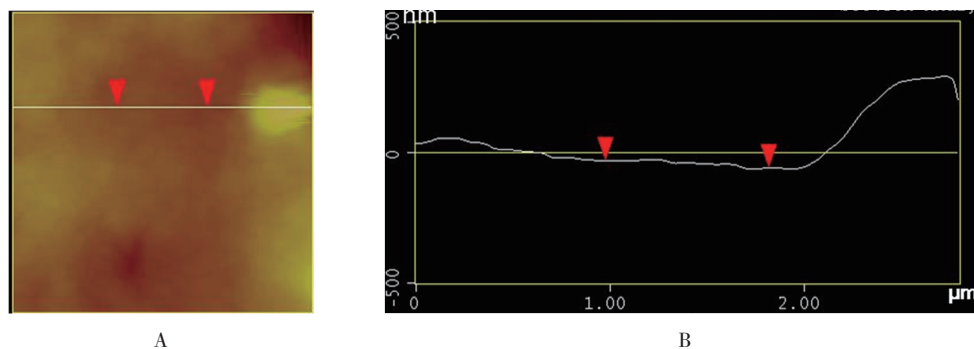


图2 AFM下鲤红细胞膜异常凸起形貌图和截面曲线图(扫描范围: $2.8\ \mu\text{m} \times 2.8\ \mu\text{m}$)

A 单个凸起形貌图; B 截面曲线图

Fig. 2 AFM images of membrane surface ultrastructure of abnormal erythrocyte and its cross section curve (Scanning range: $2.8\ \mu\text{m} \times 2.8\ \mu\text{m}$)

A is AFM images of membrane surface ultrastructure of abnormal erythrocyte; B is the cross section of figure A shown by line.

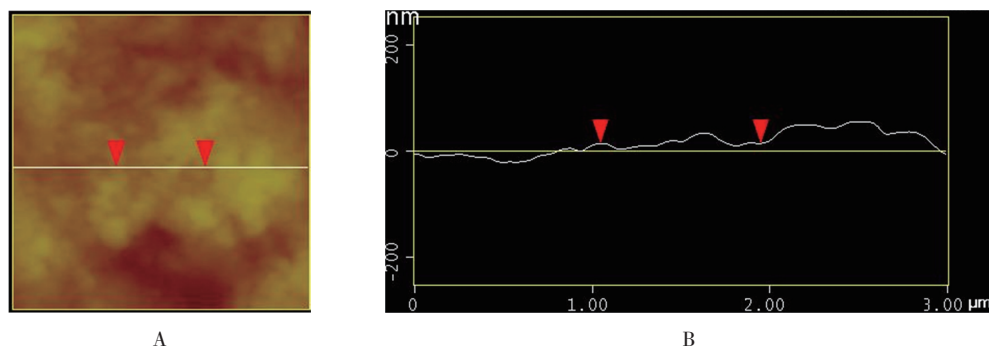


图3 AFM下鲤红细胞膜表面颗粒状物质超微结构形貌图及横截面曲线图(扫描范围: $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$)

A: 红细胞膜表面超微形貌图; B: 横截面曲线图.

Fig. 3 AFM images of membrane surface ultrastructure of a erythrocyte and its cross section curve
(Scanning range: $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$)

A is AFM images of membrane surface ultrastructure of a erythrocyte ; B is the cross section of figure A shown by line.

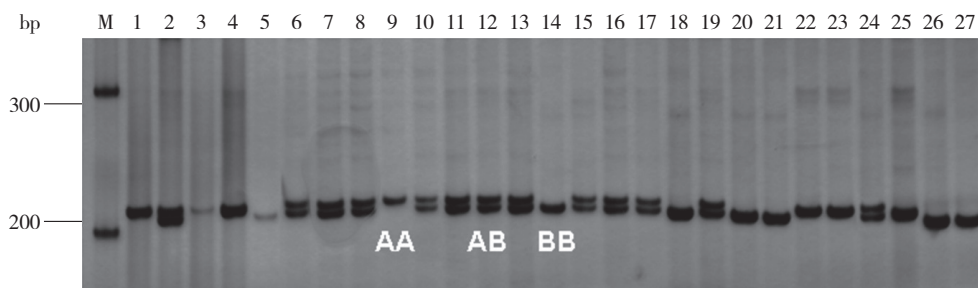


图4 引物CC005扩增鲤 F_2 个体基因组DNA得到的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

M: DNA Marker I; 2,6,10,11,12,13号鱼红细胞表面具有棘状凸起结构; 除21,24号外,其余19尾鱼细胞膜表面结构正常; AA、AB、BB分别为引物CC005扩增出的3种基因型.

Fig. 4 PAGE of carp F_2 genomic DNA amplified by primer CC005

M: DNA Marker I ; M: DNA Marker I ; Except 21 and 24, the membrane surface of 2,6,10,11,12 and 13 had spine-uplifts on the edge; the others are normal.AA、AB and BB are 3 genotypes amplified by primer CC005.

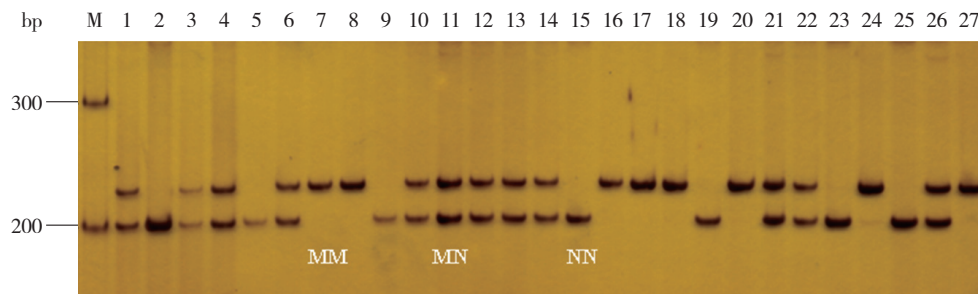


图5 引物CC062扩增鲤F₂个体基因组DNA得到的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

M: DNA Marker I; 2、6、10、11、12、13号鱼红细胞表面具有棘状凸起结构; 除21、24外,其余19尾鱼红细胞膜表面结构正常; MM、MN、NN为引物CC062扩增出的3种基因型。

Fig. 5 PAGE of carp F₂ DNA amplified by primer CC062

M: DNA Marker I; M: DNA Marker I; Except 21 and 24, the membrane surface of 2,6,10,11,12 and 13 had spine-uplifts on the edge; the others are normal. MM, MN and NN are 3 genotypes amplified by primer CC062.

2.4 CC005基因频率和基因型频率分析

由表2可见,红细胞膜表面正常组存在3种基因型AA、AB和BB,且3种基因型分布均匀,凸起组却仅存在1种杂合基因型AB。对2组基因型进行显著

性检验,该位点基因型在红细胞膜表面结构正常组与凸起组之间分布差异显著($\chi^2=8.553$, $P<0.05$),等位基因频率分布差异不显著($P>0.05$)。

表2 红细胞膜表面正常组与凸起组的CC005位点的基因型频率和等位基因频率分布

Tab. 2 Genotype and allele frequencies of CC005 between normal erythrocyte surface and abnormal groups

组别 Group	数量(总数) Number (Total)	基因型(个体数) Genotype (Nos.)	基因型频率 Genotype frequency	等位基因(频率) Allele (frequency)
I	19 (25)	AA (7) AB (6) BB (6)	0.3684 0.3158 0.3158	A (0.5263) B (0.4737)
II	6 (25)	AA (0) AB (6) BB (0)	0.000 1.000 0.000	A (0.500) B (0.500)

注: I组-膜表面正常; II组-膜表面凸起。

Note: Group I -Normal in erythrocyte surface; Group II-Abnormal in erythrocyte surface.

2.5 CC062基因频率和基因型频率分析

红细胞膜表面结构正常组在CC062位点扩增出3种基因型MM、MN和NN;红细胞膜表面结构凸起

组扩增出2种基因型,杂合子基因型的比率占83.3% (表3),卡方检验表明,该位点基因型和等位基因在2实验组之间分布不显著($P>0.05$)。

表3 红细胞膜表面正常组与凸起组的CC062位点的基因型频率和等位基因频率分布

Tab. 3 Genotype and allele frequencies of CC062 between normal erythrocyte surface and abnormal groups

组别 Group	数量(总数) Number (Total)	基因型(个体数) Genotype (Nos.)	基因型频率 Genotype frequency	等位基因(频率) Allele (frequency)
I	19 (25)	MM (7) MN (6) NN (6)	0.3684 0.3158 0.3158	A (0.5263) B (0.4737)
II	6 (25)	MM (0) MN (5) NN (1)	0.000 0.8333 0.1667	A (0.417) B (0.583)

注: I组-膜表面正常; II组-膜表面凸起。

Note: Group I -Normal in erythrocyte surface; Group II-Abnormal in erythrocyte surface.

2.6 基因型组合与红细胞膜结构的关联分析

将19尾红细胞膜结构表现正常与6尾膜结构表现凸起的实验鱼在CC005和CC062两个位点上所能扩增出的基因型进行组合,组合基因型分别为AA+MM、AB+MM、BB+MM、AA+MN、AB+MN、

BB+MN、AA+NN、AB+NN、BB+NN。由表4可以看出,有凸起结构的实验组基因型组合主要以AB+MN为主,而且这种基因型组合在红细胞膜结构正常组中不存在。卡方检验发现,2个实验组基因型分布频率差异极显著($\chi^2=21.345, P<0.01$)。

表4 红细胞膜表面正常组与凸起组的CC005和CC062位点组合基因型分布

Tab. 4 Combination genotype frequencies of CC005 and CC062 between erythrocyte surface normal and abnormal groups

组合基因型 Combination genotype		正常 Normal		凸起 Abnormal	
CC005	CC062	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
AA	MM	0	0	0	0
AB	MM	4	21.1	0	0
BB	MM	3	15.8	0	0
AA	MN	4	21.1	0	0
AB	MN	0	0	5	83.3
BB	MN	2	10.5	0	0
AA	NN	3	15.8	0	0
AB	NN	2	10.5	1	16.7
BB	NN	1	5.3	0	0
Total		19		6	

3 讨论

3.1 原子力显微镜在鱼类耐寒性研究中的应用

对AFM在生物学上的应用已有很多的报道。人们利用AFM已对DNA分子^[8-9]、RNA分子^[10]、蛋白质分子^[11]、多糖分子^[12]等的表面形态结构及生物力学特性^[13]、蛋白质-酶反应过程^[14]、细胞表面抗原-抗体反应过程^[15]的动力学特征、生物材料的微力学特性、生物大分子间的定量作用力等方面进行了大量的研究和总结。近年来AFM在结构生物学、分子生物学等学科领域的最新研究成果,特别是用AFM对生物分子成像、AFM在定量研究生物分子间的相互作用力方面的研究成果已有较详尽的论述^[16-18]。

本研究应用原子力显微镜观察低温条件下不同活力鲤血液红细胞膜表面结构,14 $\mu\text{m} \times 14 \mu\text{m}$ 扫描范围下红细胞多数呈椭圆形,长径(12.057 ± 1.293) μm ,短径(7.412 ± 1.107) μm ,与葛慕湘等^[19]对几种鱼类学细胞形态进行观测所得结果[鲤红细胞长径(11.98 ± 0.34) μm ,短径(7.76 ± 0.48) μm]相比,低温

下鲤红细胞长径变化较大,短径无太大变化。本研究中结果与杨严鸥等^[20]所得结果亦相吻合,分析这一结果的产生可能是由于温度的变化导致细胞膜的某些组分发生改变以维持细胞膜的相对流动性,从而使细胞发挥正常的生理功能。同时对不同活力实验鱼的红细胞大小进行比较,活力正常的红细胞长径为(11.990 ± 1.457) μm ,短径为(7.225 ± 1.158) μm ;活动缓慢组红细胞长径(11.938 ± 0.969) μm ,短径为(7.394 ± 0.864) μm ;病鱼组红细胞长径为(12.860 ± 1.080) μm ,短径为(8.635 ± 0.864) μm 。方差分析表明,各实验组之间长、短径无显著差异($F_{\text{长}}=0.853, P>0.05$; $F_{\text{短}}=3.081, P>0.05$),说明同种鱼类的红细胞的长、短径与低温适应性无必然联系。

在3 $\mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ 成像范围时,AFM下可观测到细胞膜表面存在颗粒聚集,推断这些颗粒应是红细胞膜蛋白分子暴露于膜表面的部分,这些膜蛋白颗粒可能作为受体、载体、离子通道、抗原和特异性酶在低温条件下发挥不同的生理作用。这一现象对深入

研究鱼类红细胞膜上的活性物质与温度的相关性奠定了基础。同时,在对红细胞膜进行扫描时,扫描范围 $14\ \mu\text{m} \times 14\ \mu\text{m}$ 和 $2.8\ \mu\text{m} \times 2.8\ \mu\text{m}$ 下均可观测到活动能力不同的实验鱼红细胞膜表面结构存在差异。与活动缓慢实验鱼相比,活力正常实验鱼的红细胞膜表面凸起更为明显,这一凸起的产生,一方面可能是细胞膜表面某些膜蛋白发生聚集,以增大细胞膜表面积,从而增加细胞膜的通透性^[9];另一方面可能细胞结构发生遗传变异,新的基因在细胞膜上表达,产生了新的膜蛋白,以适应环境温度的降低^[10];也可能是某种膜蛋白分子结构发生了变化,从而影响膜质的流动性^[11],以维持细胞的正常生理功能。本实验过程中严格控制了所用试剂的pH值,以避免红细胞发生变形对实验结果的影响。本实验是对低温下活动能力不同的鲤红细胞膜结构的一个初步探索,今后还将利用低温下差异表达的基因对低温下不同活力实验鱼的基因组DNA进行分析,筛选与低温相关的主效基因,同时通过细胞膜的原位杂交、基因的克隆等方法对鲤的低温适应性状做深入研究,以期确定红细胞膜表面出现凸起现象与鲤的耐低温性状是否存在某种必然的联系。

3.2 CC005和CC062扩增结果及与膜结构的关联性分析

在对实验鱼基因组DNA进行PCR检测中,尽管本研究已经在设计引物时采用尽量严格的条件来选择引物,并通过精细的调整退火温度来优化PCR反应的条件,但是仍出现个体扩增产物大小与预期片段不一致现象。这种情况出现的原因可能是由于在基因组DNA中经常存在内含子序列,所选取的CC005和CC062这2个基因序列是从EST中发掘出来的,如果CC005和CC062的引物位点跨越了数目不定的内含子序列,而引物的位置恰好位于内含子的两侧,就会造成扩增片段长度的明显增加。

在高等真核生物中,内含子通常是有序或组成性地从mRNA前体中被剪接,然而,也存在内含子的变位剪接,即在个体发育或细胞分化时可以有选择性地越过某些外显子或某个剪接点进行变位剪接,

产生出组织或发育阶段特异性mRNA。已有研究发现果蝇中存在与性别分化相关基因的特异性剪接,雌果蝇*sxl*基因前体mRNA中的第3个外显子直接被切除,形成功能型SXL蛋白(外显子2和4相连)。由于这个蛋白的存在,使雌果蝇*tra*基因第2个外显子的切割位点发生变化,产生功能型TRA蛋白。最后,在功能型蛋白TRA和一组SR蛋白的作用下,特异性剪接*dsx*基因的前体mRNA,产生雄性和雌性特征性DSX蛋白,参与性别分化中的一系列生理生化反应。另外,许多人类疾病是内含子剪接异常引起的,如地中海贫血病人的珠蛋白基因中,大约有1/4的核苷酸突变发生在内含子的5'或3'边界保守序列上,或者虽然位于内含子中间但干扰了前体mRNA的正常剪接^[12]。在本研究中,2个引物均扩增出片段大小不等的2条带,可能原因是内含子剪接过程中发生异常所导致,真核基因平均含有8个内含子,前体分子一般比成熟mRNA大4~10倍,如果该基因的前体mRNA在剪接过程中发生特异性,其中的某个外显子被剪接,而使间隔的另外2个外显子相连,从而导致某种特定蛋白的表达,或是这2个基因是由2个或2个以上外显子所构成,EST序列中不存在该内含子序列,而基因组DNA中却存在多个内含子,从而导致扩增结果具多态性。

CC005基因引物在低温条件下凸起和正常细胞膜表面结构有差异的实验鱼基因组DNA PCR分析中基因型分布存在显著差异($\chi^2=8.553$, $P<0.05$),膜结构表现出凸起组的基因型只有AB,而正常组中存在3种基因型;CC062基因引物在凸起组中的基因型也以杂合基因型为主,但是卡方检验表明2个细胞膜表面结构有差异的实验组中CC062的基因型分布不显著($P>0.05$);而CC005和CC062的基因型组合在2个实验组中分布存在极显著差异($\chi^2=21.345$, $P<0.01$)即:用这2个引物对基因组扩增时都出现杂合型基因型,实验鱼在低温下的活力正常,其红细胞膜有棘状凸起结构。因此,推测CC005和CC062基因多态性间对低温下游动正常鲤红细胞膜表面出现超微凸起结构的形成有协同效应,从而使个体间在低温下能够

表现出不同活力。本课题组的研究现已表明, CC062 基因在黑龙江野鲤中的表达量高于海南野鲤、俄罗斯高背鲤和建鲤(文章待发)。本研究的结果分析有助于对这2个未知新基因做进一步的克隆和功能鉴定。杂合基因型协同作用对鲤红细胞膜的结构和及其鱼体对低温的适应性育种研究具有一定的意义。这2个基因能在鲤低温适应性分子标记辅助选择育种中应用于还需要进一步验证。

参考文献:

- [1] Hazel JR. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish [J]. *Am J Physiol*, 1984, 246: 60–70.
- [2] Dey I, Buda C, T Wiik, et al. Molecular and structural composition of phospholipids membranes in livers of marine and freshwater fish in relation to temperature [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90 (16): 7 498–7 502.
- [3] Devries AL, Chen L, Cheng CHC. Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in Antarctic notothenioid fish and Arctic cod [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 3 817–3 822.
- [4] 常玉梅, 孙效文, 梁利群. 鲤鱼耐寒性状研究[J]. *上海水产大学学报*, 2003, 12 (2): 102–105.
- [5] 梁利群, 李绍戊, 常玉梅, 等. 抑制消减杂交技术在鲤鱼耐寒研究中的应用[J]. *中国水产科学*, 2006, 13 (2): 193–199.
- [6] Trueman R J, Tiku P E, Caddick M X, et al. Thermal thresholds of lipid restructuring and $\Delta 9$ -desaturase expression in the liver of carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *J Exper Biol*, 2000, 203: 641–650.
- [7] 常玉梅, 匡友谊, 曹鼎臣, 等. 低温胁迫对鲤血液学和血清生化指标的影响[J]. *水产学报*, 2006, 30 (5): 701–706.
- [8] Pope LH, Davies MC, Laughton CA, et al. Force-induced melting of a short DNA double helix [J]. *Eur Biophys*, 2001, 30 (1): 53–62.
- [9] Martinkina LP, Klinov DV, Kolesnikov AA, et al. Atomic force and electron microscopy of high molecular weight circular DNA complexes with synthetic oligopeptide trivaline [J]. *Biomol Struct Dyn*, 2000, 17 (4): 687–695.
- [10] Medalia O, Heim M, Guckenberger R, et al. Gold-tagged RNA-A probe for macromolecular assemblies [J]. *Struct Biol*, 1999, 127 (2): 113–119.
- [11] Walkinshaw MD, Taylor P, Sturrock S S, et al. Structure of ocr from bacteriophage T7, a protein that mimics B-form DNA [J]. *Mol Cell*, 2002, 9 (1): 187–194.
- [12] Baker AA, Miles MJ, Helbert W. Internal structure of the starch granule revealed by AFM [J]. *Carbohydr Res*, 2001, 330 (2): 249–256.
- [13] AI-Assaf S, Phillips GO, Gunning AP, et al. Molecular interaction studies of the hyaluronan derivative, hylan A using atomic force microscopy [J]. *Carbohydr Polym*, 2002, 47 (4): 341–345.
- [14] Ellis DJ, Dryden DTF, Berge T, et al. Direct observation of DNA translocation and cleavage by the EcoK1 endonuclease using atomic force microscopy [J]. *Nat Struct Biol*, 1999, 6 (1): 15–17.
- [15] Willemsen OH, Snel MME, Van Der Werf KO, et al. Simultaneous height and adhesion imaging of antibody-antigen interactions by atomic force microscopy [J]. *Biophys J*, 1998, 75 (5): 2 220–2 228.
- [16] Daniel M C, Iwamoto H, Shao Z F. Atomic force microscopy in structural biology: from the subcellular to the submolecular [J]. *Electron Microsc*, 2000, 49 (3): 395–406.
- [17] Willemsen OH, Snel MME, Cambi A, et al. Biomolecular interactions measured by atomic force microscopy [J]. *Biophys J*, 2000, 79 (6): 3 267–3 281.
- [18] Alatanova J, Lindsay SM, Leuba SH. Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2000, 74 (1–2): 37–61.
- [19] 葛慕湘, 靳晓敏, 王华彬, 等. 几种鱼类血细胞的形态观察[J]. *水利渔业*, 2006, 26 (2): 19–21.
- [20] 杨严鸥, 姚峰, 吴继鹏, 等. 温度对黄颡鱼血细胞数量及血清生化成分的影响[J]. *长江大学学报*, 2005, 2 (11): 58–62.
- [21] 人民教育出版社生物室. 生物教育教学用书[M]. 北京: 人民教育出版社, 2002: 20–25.
- [22] 关维, 纪小龙, 范丽娜. 原子力显微镜对正常细胞、肿瘤细胞细胞膜表面形态结构的观察[J]. *中国实验诊断学*, 2006, 10 (9): 951–954.
- [23] 施岩, 杨建中, 周子亮. 红细胞膜蛋白结构变化对膜脂流动性的影响[J]. *承德医学院学报*, 2002, 19 (2): 94–95.
- [24] 朱玉贤, 李毅. 现代分子生物学: 第2版[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 91–92.

Erythrocyte membrane surface structure of different vitality of *Cyprinus carpio* under low temperature conditions and analysis of related genes

DING Lei^{1,3}, LI Yong^{1,3}, LI Yan^{1,3}, CHANG Yu-mei³, LIANG Li-qun^{1,2,3}, LEI Qing-quan²

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 2. Harbin University of Science and Technology, Harbin 150080, China; 3. College of Life Science and Technology, DaLian Fisheries University, Dalian 110623, China.)

Abstract: Cold tolerance is one of the major economic characteristics in fish. Although lots of research has been conducted by fish biologists, the molecular mechanism about cold tolerance is still not available. Experiments were conducted to study: 1) the polymorphism of the new CC005 (Genbank Accession Number was FF339846) and CC062 (Genbank Accession Number was FF677502) differentially expressed genes and 2) the relationship between the carp erythrocyte structures under the temperature of $(4.0 \pm 2.0) ^\circ\text{C}$. The F2 of purse red carp cold-tolerant strains (*Cyprinus carpio* var. wananensis) and Boshi carp (*C. pellegrini*) were used as experimental objects in this study. Erythrocyte membrane surface structure with different vitality experimental fish was compared under atomic force microscope (AFM). The results showed that: the length of erythrocytes from normal vitality fish is $(11.990 \pm 1.457) \mu\text{m}$ and the short axis is $(7.225 \pm 1.158) \mu\text{m}$; the length of erythrocytes from slower fish is $(11.938 \pm 0.969) \mu\text{m}$ and the short axis is $(7.394 \pm 0.864) \mu\text{m}$; the length of erythrocytes from the sick fish group is $(12.860 \pm 1.080) \mu\text{m}$ and the short axis is $(8.635 \pm 0.864) \mu\text{m}$. The variance analysis showed that there is no significant difference in both the length ($F=0.853$, $P>0.05$) and the short axis of the erythrocytes ($F=3.081$, $P>0.05$). Under $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ scanning reach, different size particles on the membrane surface were observed and found to be the exposed part of the erythrocyte membrane protein molecules. The erythrocytes from the normal vitality fish had several spine-uplifts on the edge. It was also found that all erythrocytes had same spin-uplifts. Being measured, these uplifts are about 500 nm in diameter and 300 nm high. The erythrocyte structures from sick fish with white spots differed from those from normal and slow vitality fish. In addition, Analysis showed that the two unknown genes CC005 and CC062 have significant differences in their genotypes between the membrane surface structure with uplifts group and the normal surface structure group ($\chi^2=21.345$, $P<0.01$). Thus, we can assume that the carp erythrocyte membrane structure is controlled by the genes related to the low-temperature. The result of this study would provide theoretical basis for the study of carp cold tolerance and breeding using marker-assisted selection. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (4): 496–505]

Key words: *Cyprinus carpio*; low temperature; erythrocyte membrane; differentially expressed genes

Corresponding author: LIANG Li-qun. E-mail: llq-1019@163.com