

黄河裸裂尻鱼细胞色素 C 氧化酶 I、II 和 III 亚基基因的克隆及序列特征分析

晁燕^① 祁得林^{①*} 申志新^② 王国杰^② 杨成^②

① 青海大学农牧学院动物科学系 西宁 810016; ② 青海省渔业环境监测站 西宁 810012

摘要: 采用 RT-PCR 技术克隆获得了黄河裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis pylzovi*) CO I、II、III 基因的编码序列, 并对此进行了初步分析。结果表明, 黄河裸裂尻鱼 CO I 基因全长为 1 551 bp, 开放阅读框 (ORF) 由基因全长组成, 编码 516 个氨基酸; CO II 基因全长为 691 bp, 开放阅读框为 690 bp, 编码 230 个氨基酸; CO III 基因全长为 786 bp, 其开放阅读框也是由基因全长组成, 编码 261 个氨基酸。序列同源性分析显示, 黄河裸裂尻鱼与其他 9 种鲤科鱼类 3 个亚基在基因和氨基酸序列上均有较高的同源性, 虽然不同物种亚基基因间存在序列差异, 但是所编码的氨基酸序列却趋于一致, 揭示了鲤科鱼类细胞色素 C 氧化酶在线粒体呼吸链电子传递中的功能稳定性。黄河裸裂尻鱼与滇池金线鲃 (*Sinocyclocheilus grahami*) 在 CO I 和 CO II 亚基上均存在相同位置、相同种类和相同数量的功能位点, 而且在基于 CO I 亚基基因和氨基酸序列、CO II 及 CO III 亚基基因序列的系统发育树中聚在同一支上, 表明两者具有较近的亲缘关系, 该结论与裂腹鱼亚科鱼类起源于晚第三纪广泛分布于青藏地区的喜温性原始鲃类的观点相一致。

关键词: 黄河裸裂尻鱼; 细胞色素 C 亚基基因; 序列分析; 系统发育

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2011)04-16-09

Cloning and Sequence Analysis of Genes Encoding mtDNA Cytochrome C Oxidase Subunits I, II and III in *Schizopygopsis pylzovi*

CHAO Yan^① QI De-Lin^{①*} SHEN Zhi-Xin^② WANG Guo-Jie^② YANG Cheng^②

① Animal Science Department, Agriculture and Animal Husbandry College, Qinghai University, Xining 810016;

② Fishery Environmental Monitoring Station of Qinghai Province, Xining 810012, China

Abstract: The complete sequences of genes encoding cytochrome C oxidase subunits I, II and III were cloned in *Schizopygopsis pylzovi* by RT-PCR method. The sequence analysis showed that the complete sequence of CO I was 1 551 bp, which consisted of the open reading frame (ORF) encoding 516 amino acid residues; the CO II gene was 691 bp and contained a 690-nucleotide ORF encoding 230 amino acid residues; and the CO III gene was 786 bp, which was composed of the ORF encoding 261 amino acid residues. The homologous analysis of sequences showed high similarity both in DNA and corresponding amino acid sequences of CO I, CO II and CO III between *S. pylzovi* and other 9 species from family Cyprinidae. Although there were sequence differences in subunit genes among different species, the corresponding amino acids tended to be consistent, suggesting

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30860048), 教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (No. NCET-09-0861);

* 通讯作者, E-mail: delinqi@126.com;

第一作者介绍 晁燕, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物遗传繁育; E-mail: chaoyanqh@126.com。

收稿日期: 2010-11-29, 修回日期: 2011-04-29

functional stability of cytochrome C oxidase in electron transfer of mitochondrial respiration chain. *S. pylzovi* and *Sinocyclocheilus grahami* clustered together in the phylogenetic trees based on gene and amino acid sequences of *CO I*, and gene sequences of *CO II* and *CO III*, coupled with the same types, positions and numbers of functional sites in *CO I* and *CO II*, suggesting that there is a relatively close relationship between them, which is consistent with the conclusion that the subfamily Schizothoracinae is originated from one of the primitive Barbinae fishes widely distributed in warm drainages in Qinghai-Tibetan Plateau during the Tertiary Period.

Key words: *Schizopygopsis pylzovi*; Cytochrome C oxidase subunit gene; Sequence analysis; Phylogenetics

细胞色素 C 氧化酶(cytochrome C oxidase, CO),即线粒体呼吸链复合体IV,属于亚铁血红素-铜氧化酶的超家族,是真核生物和大多数细菌线粒体呼吸电子传递链终端氧化酶,也是线粒体氧化能力的关键调节部位和权衡线粒体特性及数量的标志性酶^[1-3]。该酶利用从亚铁细胞色素 C 传来的电子催化氧的 4 个电子还原,并产生质子电化学电位梯度,同时把氧化还原反应中的能量通过氧化磷酸化转变为含高能磷酸键的 ATP,在能量产生中起主要作用。动物的细胞色素 C 氧化酶由 13 个亚基组成,其中 3 个大亚基(CO I、CO II 和 CO III)由线粒体基因(mtDNA)编码合成,具有酶催化活性^[4]。研究表明,冷血脊椎动物在冷暴露过程中会导致一系列的适应性变化,从而补偿低温对新陈代谢过程产生的不利影响,其中 CO I 和 CO II 亚基基因的特异性转录、表达调控机制在冷血脊椎动物的冷适应过程中发挥了至关重要的作用^[2-3]。迄今为止,对 CO I 和 CO II 的研究较为深入,但是对 CO III 的研究并不多,其功能目前尚不完全清楚^[5]。

黄河裸裂尻鱼(*Schizopygopsis pylzovi*)隶属鲤形目(Cypriniformes)鲤科(Cyprinidae)裂腹鱼亚科(Schizothoracinae)裸裂尻鱼属,分布于兰州以上黄河水系的干流、附属水体以及支流大通河、湟水河和柴达木水系^[6],是裸裂尻鱼属中分布最为广泛的种类之一。以往关于黄河裸裂尻鱼的研究主要集中在形态分类和生态学等宏观领域^[7-9],分子方面的研究仅见基于线粒体细胞色素 *b* 基因(Cyt *b*)的系统发育及遗传结构研究^[10-13]。本研究以广泛分布于高原水系的黄河裸裂尻鱼为对象,克隆得到线粒体

CO I、CO II 和 CO III 亚基基因的全序列,并分析了各亚基蛋白肽链的结构特性,为研究高原鱼类在低氧和季节性寒冷适应过程中 CO I、CO II 及 CO III 亚基基因的特异性转录、表达调控机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集 黄河裸裂尻鱼采集于黄河水系湟水河支流,地理坐标 37°14.412'N, 101°28.602'E,海拔 2 875 m。采集活体鱼 5 尾,带回实验室后,取肌肉组织保存于液氮中。另外,从 GenBank 下载鲤科其他亚科 9 种鱼类的线粒体全基因组(表 1),以进行细胞色素 C 氧化酶各亚基基因及其编码蛋白的氨基酸序列进行比较和分析。在系统发育分析中,以脂鲤科(Characidae)刚果脂鲤(*Phenacogrammus interruptus*, AB054129)作为外群^[14]。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 参考鲤(*Cyprinus carpio*; X61010)、银鲫(*Carassius auratus langsdorfi*; AB006953)和青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*; AB239595)的线粒体基因组全长序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 CO I、CO II、CO III 亚基基因上下游引物(表 2),引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成

总 RNA 的提取与纯化参照 RNAiso Plus (TaKaRa)试剂盒推荐方法,cDNA 第一链的合成使用 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (TaKaRa),以黄河裸裂尻鱼肌肉总 RNA 为模板,分别以 COX1R、COX2R 和 COX3R 为反转录引物,按试剂盒推荐方法进行操作。

表 1 鲤科 9 种鱼类 GenBank 登录号

Table 1 GenBank accession number of 9 species from family Cyprinidae

物种 Species	亚科 Subfamily	GenBank 登录号 GenBank accession number
马口鱼 <i>Opsariichthys bidens</i>	亚科 Danioninae	DQ367044
青鱼 <i>Mylopharyngodon piceus</i>	雅罗鱼亚科 Leuciscinae	EU979306
蒙古鲃 <i>Culter mongolicus</i>	鲃亚科 Cultrinae	AP009060
黄尾鲴 <i>Xenocypris davidi</i>	鲴亚科 Xenocyprinae	GQ289558
鲮 <i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	鲮亚科 Hypophthalmichthyinae	EU343733
鳊 <i>Gobio gobio</i>	亚科 Gobioninae	AB239596
细鳞 <i>Acheilognathus typus</i>	亚科 Acheilognathinae	NC_008668
滇池金线鲃 <i>Sinocyclocheilus grahami</i>	鲃亚科 Barbinae	GQ148557
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	鲤亚科 Cyprininae	X61010

表 2 黄河裸裂尻鱼 CO I、II、III 亚基基因扩增引物

Table 2 Primers for cytochrome C oxidase subunits I, II and III genes amplification in *Schizopygopsis pylzovi*

引物名称 Primer name	引物类型 Primer type	序列信息 (5' - 3') Sequences
COX1F	正向 Forward	CTAAACACTCGGCTACCCTAC
COX1R	反向 Reverse	TGGTTATGTGGCTGGCTTGAA
COX2F	正向 Forward	AAGGTGAAATCGTAGGTTAAAT
COX2R	反向 Reverse	AAAAGGCCAACGCTCTGTCCAA
COX3F	正向 Forward	TGTATTGTACTTCTTTTAACGCTGT
COX3R	反向 Reverse	AAGATTATGAGCCTCATCAATAGATT

1.2.3 目标基因 PCR 扩增与测序 以黄河裸裂尻鱼肌肉 cDNA 为模板扩增目标片段。PCR 扩增反应体系 30 μ l, 其中包括 1.0 U EX *Taq* (TaKaRa), 1 μ l dNTPs (2.5 mmol/L), 3.0 μ l 10 $\times$ *Taq* buffer (TaKaRa, 含 Mg^{2+}), 两条引物 (10 mmol/L) 各 0.5 μ l, 0.2 μ g 模板 DNA。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 续延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳后, 用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 (TaKaRa) 试剂盒进行回收纯化, 然后克隆至 PMD18-T 载体中 (TaKaRa), 转化感受态 *E. coli* DH 5 α , PCR 检测阳性克隆后送北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。

1.2.4 数据分析 利用 Lasergene 7.0^[15] 软件, 按脊椎动物线粒体基因组遗传密码, 对所克

隆的基因序列进行阅读框分析、氨基酸序列推定; 利用 DNAMAN Version 6.0 (<http://www.lynnon.com>) 进行基因序列和氨基酸序列同源性比较; 利用 ExPASy-Tools (<http://www.expasy.ch/tools/>) 对 CO I、CO II、CO III 蛋白的生化特性和蛋白质功能位点进行预测分析; 利用 MEGA 3.1^[16] 软件进行碱基组成和变异分析, 并构建邻接 (neighbor-joining, NJ) 系统发育树。

2 结果与分析

2.1 序列分析 黄河裸裂尻鱼 CO I、CO II 和 CO III 均获得全长序列, 序列已提交 GenBank, 登录号分别为 HQ646251、HQ646252 和 HQ646250。黄河裸裂尻鱼 CO I 基因全长为 1 551 bp, 开放阅读框 (ORF) 由基因全长组成, 编码 516 个氨基酸, 起始密码子为 GTG, 终止密码子为 TAA, 编码的蛋白分子量为 56 844.94 u, 等电点为 6.05; CO II 亚基基因全长为 691 bp, 开放阅读框为 690 bp, 编码 230 个氨基酸, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为不完全终止密码子 T, 编码的蛋白分子量为 26 117.33 u, 等电点为 4.64; CO III 亚基基因全长为 786 bp, 开放阅读框由基因全长组成, 编码 261 个氨基酸, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA, 所编码的蛋白分子量为 29 599.39 u, 等电点为 6.10。

编码蛋白的拓扑结构预测显示: 黄河裸裂

尻鱼 CO I 蛋白上有 14 个 N-酰基化位点 (N-myristoylation site)、4 个 N-糖基化位点 (N-glycosylation site)、5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (casein kinase II phosphorylation site)、3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (protein kinase C phosphorylation site)、1 个酰胺化位点 (amidation site) 和 1 个环腺苷酸及环鸟苷酸依赖蛋白激酶磷酸化位点 (cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site); CO II 蛋白上有 4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、3 个 N-糖基化位点和 2 个 N-酰基化位点; CO III 蛋白上有 5 个

N-酰基化位点和 3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点。

2.2 细胞色素 C 氧化酶各亚基基因和氨基酸序列同源性分析 序列同源性分析结果显示: 黄河裸裂尻鱼与马口鱼、青鱼、蒙古鲌、黄尾鲴、鳊、细鳞、滇池金线鲃和鲤之间 CO I 亚基基因序列同源性 82.59% ~ 86.91%, 氨基酸序列同源性 97.29% ~ 98.45%; CO II 亚基基因序列同源性 82.78% ~ 87.70%, 氨基酸序列同源性 95.22% ~ 96.09%; CO III 亚基基因序列同源性 81.30% ~ 86.90%, 氨基酸序列同源性 94.25% ~ 96.55% (表 3)。

表 3 黄河裸裂尻鱼与其他 9 种鲤科鱼类 CO 各亚基基因和编码蛋白氨基酸序列的同源性分析 (%)
Table 3 Homologous analysis of DNA and corresponding amino acid sequences of CO I, CO II and CO III genes between *Schizopygopsis pylzovi* and other 9 species from family Cyprinidae

物种 Species	CO I		CO II		CO III	
	基因序列 Gene sequence	氨基酸序列 Amino acid sequence	基因序列 Gene sequence	氨基酸序列 Amino acid sequence	基因序列 Gene sequence	氨基酸序列 Amino acid sequence
马口鱼 <i>Opsariichthys bidens</i>	83.75	96.90	82.78	96.09	81.30	94.25
青鱼 <i>Mylopharyngodon piceus</i>	85.30	97.29	84.80	96.09	82.82	94.64
蒙古鲌 <i>Culter mongolicus</i>	84.46	97.48	85.38	96.09	83.72	95.02
黄尾鲴 <i>Xenocypris davidi</i>	85.43	97.48	85.24	96.09	83.08	94.64
鳊 <i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	85.04	97.48	83.94	96.09	82.70	94.64
<i>Gobio gobio</i>	84.98	97.87	84.66	95.65	83.21	95.40
细鳞 <i>Acheilognathus typus</i>	82.59	97.40	83.79	96.09	81.68	95.02
滇池金线鲃 <i>Sinocyclocheilus grahami</i>	86.91	98.45	87.70	95.65	85.24	95.02
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	86.40	97.87	87.12	95.22	86.90	96.55

2.3 蛋白质生化特性及功能位点比较分析 蛋白质生化特性及功能位点比较分析结果显示,黄河裸裂尻鱼与滇池金线鲃和鲤在 CO I 亚基上存在相同位置、相同种类及相同数量的功能位点,与滇池金线鲃和细鳞在 CO II 亚基上存在具有相同位置、相同种类和相同数量的功能位点,而 CO III 亚基功能位点与其他种存在差异 (表 4)。

2.4 系统发育分析 利用 MEGA 3.0 软件分别构建了黄河裸裂尻鱼与鲤科其他亚科 9 种鱼类基于细胞色素氧化酶各亚基基因序列和氨基酸序列的邻接 (NJ) 系统发育树 (图 1 ~ 3)。结果显示,在基于 CO I 亚基基因序列和氨基酸序

列以及 CO II、CO III 亚基基因序列的系统发育树中,黄河裸裂尻鱼、滇池金线鲃和鲤均聚于一支,形成单系群;而在基于 CO II、CO III 亚基氨基酸序列的系统发育树中,未获得相同结果。

3 讨 论

序列同源性分析表明,黄河裸裂尻鱼与滇池金线鲃在 CO I 亚基基因和氨基酸序列上均存在较高的同源性;在 CO II 亚基中,黄河裸裂尻鱼与滇池金线鲃存在较高的基因序列同源性,而与细鳞存在较高的氨基酸序列同源性;在 CO III 亚基中,黄河裸裂尻鱼与鲤存在较高的基因和氨基酸序列同源性。系统发育分析结果

表 4 黄河裸裂尻鱼和 9 种鲤科鱼类 CO I、CO II 和 CO III 亚基生化特性及功能位点比较
Table 4 Biochemical characteristics and domain features of cytochrome C oxidase subunits I, II and III for *Schizopygopsis pylzovi* and other 9 species from family Cyprinidae

物种 Species	蛋白分子量(u) Molecular weight			等电点(pI) Isoelectric point			N-M			N-G			CK-2			PKC			Amidation			cAMP- and cGMP		
	CO I	CO II	CO III	CO I	CO II	CO III	CO I	CO II	CO III	CO I	CO II	CO III	CO I	CO II	CO III	CO I	CO II	CO III	CO I	CO II	CO III	CO I	CO II	CO III
黄河裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis pylzovi</i>	56 844.9	26 117.3	29 599.4	6.05	4.64	6.10	14	2	5	4	3	5	2	3	3	4	4	1	1	1	1	1	1	1
马口鱼 <i>Opsariichthys bidens</i>	56 708.8	26 049.2	29 524.2	6.01	4.65	6.01	14	2	6	5	2	7	2	3	3	4	4	1	1	1	1	1	1	1
青鱼 <i>Mylopharyngodon piceus</i>	56 783.8	26 049.2	29 616.4	5.93	4.65	6.01	14	2	6	5	2	7	2	2	2	4	4	1	1	1	1	1	1	1
蒙古鲃 <i>Culter mongolicus</i>	56 862.9	26 049.2	29 604.3	6.05	4.65	6.01	14	2	6	5	2	7	2	3	2	4	4	1	1	1	1	1	1	1
黄尾鲴 <i>Xenocypris davidi</i>	56 811.8	26 049.2	29 616.4	5.93	4.65	6.01	14	2	6	5	2	7	2	2	2	4	4	1	1	1	1	1	1	1
鳊 <i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	56 811.8	26 049.2	29 666.4	5.93	4.65	6.01	14	2	5	5	2	7	2	2	2	4	4	1	1	1	1	1	1	1
鳊 <i>Gobio gobio</i>	56 859.8	26 063.2	29 520.2	6.01	4.65	6.01	14	2	6	5	2	7	2	3	3	4	4	1	1	1	1	1	1	1
细鳞 <i>Acheilognathus typus</i>	56 797.8	26 090.3	29 622.4	5.93	4.65	6.01	14	2	6	5	3	7	2	2	2	4	4	1	1	1	1	1	1	1
滇池金线鲃 <i>Sinocyclocheilus grahami</i>	56 905.0	26 106.3	29 720.5	6.05	4.65	6.01	14	2	6	4	3	5	2	2	3	4	4	1	1	1	1	1	1	1
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	56 811.8	25 999.3	29 640.4	5.93	4.79	6.01	14	2	6	4	2	5	2	2	3	4	4	1	1	1	1	1	1	1

N-M; N-酰基化位点; N-G; N-糖基化位点; CK-2; 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点; PKC; 蛋白激酶 II 磷酸化位点; Amidation; 酰胺化位点; cAMP- and cGMP- 依赖磷酸化位点。
N-M; N-myristoylation site; N-G; N-glycosylation site; CK-2; Casein kinase II phosphorylation site; PKC; Protein kinase C phosphorylation site; Amidation; Amidation site; cAMP- and cGMP- dependent protein kinase phosphorylation site.

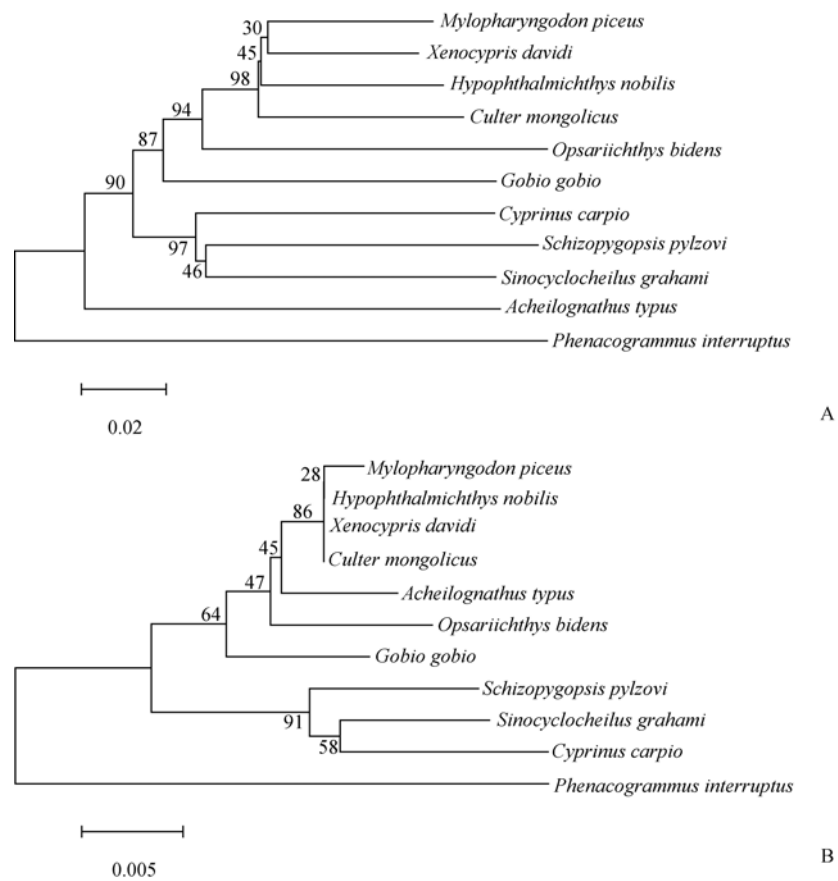


图 1 黄河裸裂尻鱼与其他 9 种鲤科鱼类基于 *CO I* 亚基基因和氨基酸序列的邻接系统发育树

Fig.1 The neighbor-joining phylogenetic tree for *Schizopygopsis pylzovi* and nine other species from Cyprinidae based on gene and amino acid sequences of cytochrome C oxidase subunit I

A. 基于 *CO I* 亚基基因序列的系统发育树; B. 基于 *CO I* 亚基氨基酸序列的系统发育树。
节点上数据表示 1 000 次重复的支持率(%)。

A. Phylogenetic tree based on gene sequence of *CO I*; B. Phylogenetic tree based on amino acid sequence of *CO I*.
Numbers at the nodes denote the bootstrap values of 1 000 replicates (%).

Opsariichthys bidens: 马口鱼;*Mylopharyngodon piceus*: 青鱼;*Culter mongolicus*: 蒙古鲮;*Xenocypris davidi*: 黄尾鲴;*Hypophthalmichthys nobilis*: 鳊;*Gobio gobio*: 鲈;*Acheilognathus typus*: 细鳞 鲈;
Sinocyclocheilus grahami: 滇池金线鲃;*Cyprinus carpio*: 鲤。

表明,黄河裸裂尻鱼、滇池金线鲃及鲤在基于 *CO I* 亚基基因和氨基酸序列、*CO II* 及 *CO III* 亚基基因序列的系统发育树中,均聚于一支形成单系群,这与 Saitoh 等^[17]利用线粒体全基因组在研究鲤科鱼类系统发育关系时获得的结论一致。但是,在基于 *CO II*、*CO III* 亚基氨基酸序列的系统发育树中未获得相同结果,结合序列同源性分析结果表明,黄河裸裂尻鱼与其他 9 种鲤科鱼类之间在细胞色素 C 氧化酶各亚基基

因序列所存在的突变多数是密码子第二、三位的突变,并没有引起氨基酸序列的实质性改变(同义突变)。因此,就鲤科鱼类系统发育分析而言,选择细胞色素 C 氧化酶基因序列,特别是 *CO I* 亚基基因序列构建系统发育树更为合理。

细胞色素 C 氧化酶 *CO I*、II 亚基基因编码蛋白功能位点的预测和比较分析显示,黄河裸裂尻鱼与滇池金线鲃和鲤鱼在 *CO I* 亚基上存

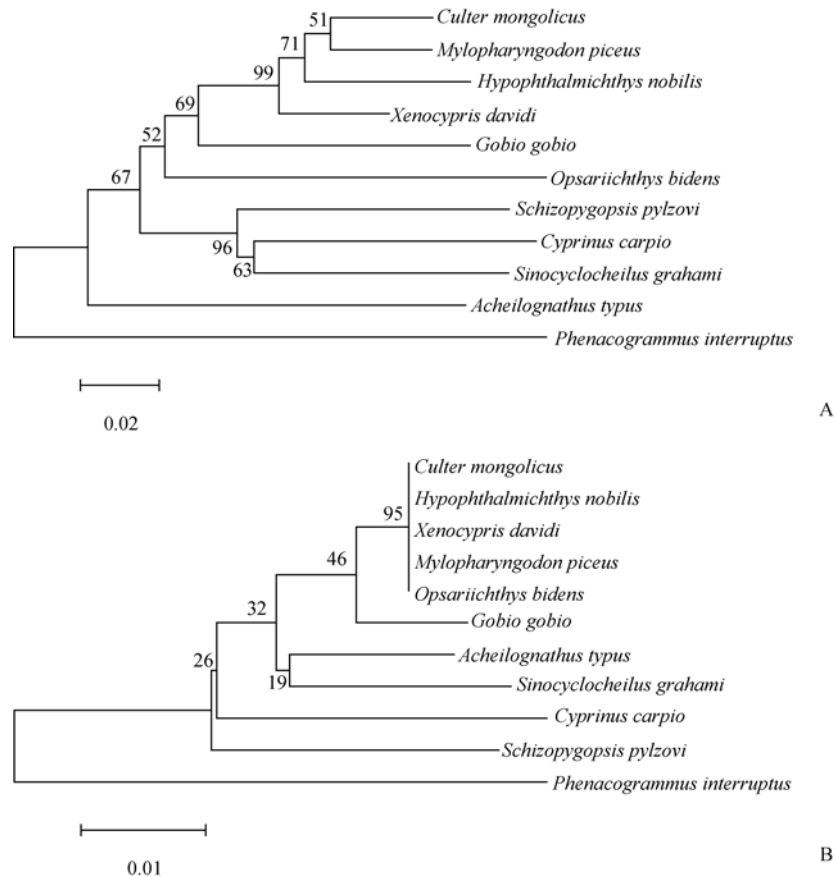


图2 黄河裸裂尻鱼与其他9种鲤科鱼类基于CO II亚基基因和氨基酸序列的邻接系统发育树

Fig.2 The neighbor-joining phylogenetic tree for *Schizopygopsis pylzovi* and nine other species from Cyprinidae based on gene and amino acid sequences of cytochrome C oxidase subunit II

A. 基于CO II亚基基因序列的系统发育树; B. 基于CO II亚基氨基酸序列的系统发育树。

节点上数据表示1 000次重复的支持率(%)。

A. Phylogenetic tree based on gene sequence of CO II; B. Phylogenetic tree based on amino acid sequence of CO II.

Numbers at the nodes denote the bootstrap values of 1 000 replicates (%).

在相同位置、相同种类及相同数量的功能位点;与青鱼、蒙古鲌、黄尾鲴、鳊和细鳞相比,黄河裸裂尻鱼少1个N-酰基化位点和2个酪蛋白激酶II磷酸化位点,但是多1个蛋白激酶C磷酸化位点;与马口鱼和相比,黄河裸裂尻鱼少1个N-酰基化位点和2个酪蛋白激酶II磷酸化位点。黄河裸裂尻鱼与滇池金线鲃和细鳞在CO II亚基上具有相同位置、相同种类及相同数量的功能位点;与其他种相比,多1个N-糖基化位点。表明细胞色素C氧化酶I和II亚基各功能位点在以上鲤科鱼类中差异较小,揭示了细胞色素C氧化酶I和II亚基在线粒体呼

吸链电子传递中的功能稳定性,同时也表明了细胞色素C氧化酶I和II亚基在组成线粒体呼吸链复合体IV中的重要性。黄河裸裂尻鱼与滇池金线鲃在CO I和CO II亚基上均存在相同位置、相同种类和相同数量的功能位点,而且在基于CO I亚基基因和氨基酸序列、CO II及CO III亚基基因序列的系统发育树中聚在同一支上,表明具有较近的亲缘关系,该结论与以往研究观点,即裂腹鱼亚科鱼类起源于晚第三纪广泛分布于青藏地区的喜温性原始鲃类,是伴随高原的逐步隆升和气候变化通过适应性进化而形成的一个适应于高原特殊环境的自然类群相

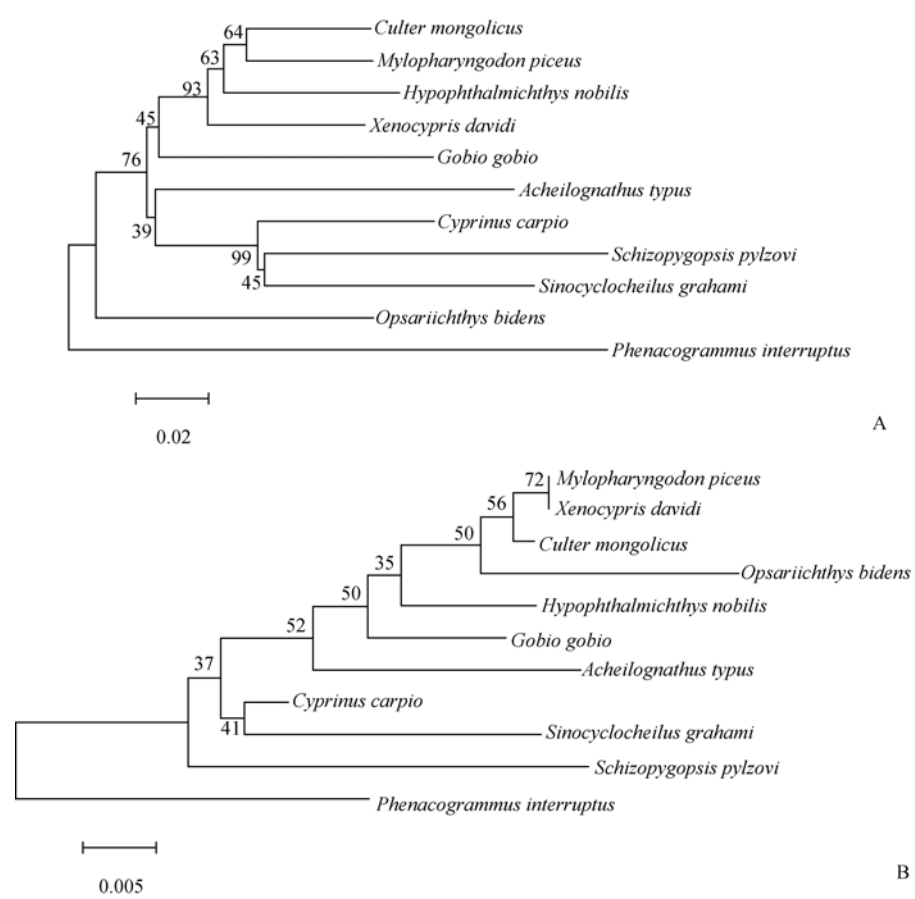


图 3 黄河裸裂尻鱼与其他 9 种鲤科鱼类基于 COⅢ亚基基因和氨基酸序列的邻接系统发育树
Fig.3 The neighbor-joining phylogenetic tree for *Schizopygopsis pylzovi* and nine other species from Cyprinidae based on gene and amino acid sequences of cytochrome C oxidase subunit III

A. 基于 COⅢ亚基基因序列的系统发育树; B. 基于 COⅢ亚基氨基酸序列的系统发育树。
节点上数据表示 1 000 次重复的支持率(%)。

A. Phylogenetic tree based on gene sequence of COⅢ; B. Phylogenetic tree based on amino acid sequence of COⅢ.
Numbers at the nodes denote the bootstrap values of 1 000 replicates (%).

一致^[6-7,9]。

目前,对于 CO I 和 CO II 亚基的研究比较深入,但对 COⅢ亚基的研究不多,其功能尚不完全清楚,很可能参与细胞色素 C 氧化酶的装配或形成氧气通道以引导氧气到达活性位点^[18-19]。编码蛋白拓扑结构的预测和比较显示,黄河裸裂尻鱼 COⅢ亚基在功能位点的种类和数量上既不同于滇池金线鲃,又有别于其他物种,表现出其独特性。研究表明,冷血脊椎动物在季节性冷适应过程中常常通过线粒体的大幅增殖或提高线粒体代谢相关酶的活性来加强有氧代谢功能,补偿低温对新陈代谢过程产生

的不利影响^[2-3,20-21]。黄河裸裂尻鱼是一种适应于青藏高原低氧、季节性冷环境的土著鱼类,其 COⅢ亚基在功能位点上的特异性是否与细胞色素 C 氧化酶的装配或通过氧通道调控氧化酶的活性有关值得进一步研究。

参 考 文 献

[1] 江海洪, 谢燕. 细胞色素 C 氧化酶的分子生物学研究进展. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 2001, 2 (1): 20-22.
[2] Lucassen M, Schmidt A, Eckerle L G, et al. Mitochondrial proliferation in the permanent vs. temporary cold: enzyme activities and mRNA levels in Antarctic and

- temperate zoarcid fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, 285: 1410 – 1420.
- [3] Lucassen M, Koschnick N, Eckerle L G, et al. Mitochondrial mechanisms of cold adaptation in cod (*Gadus morhua* L.) populations from different climatic zones. *The Journal of Experimental Biology*, 2006, 209 (13): 2462 – 2471.
- [4] Kadenbach B, Barth J, Akgün R, et al. Regulation of mitochondrial energy generation in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1271(1): 103 – 109.
- [5] 李连之, 黄仲贤. 细胞色素 C 氧化酶研究新进展. *无机化学学报*, 2001, 17(6): 761 – 774.
- [6] 武云飞, 吴翠珍. 青藏高原鱼类. 成都: 四川科学技术出版社, 1991.
- [7] 武云飞. 中国裂腹鱼亚科鱼类分类与系统关系研究. *高原生物学集刊*, 1984, 3: 119 – 139.
- [8] 陈毅峰, 曹文宣. 裂腹鱼亚科鱼类的分类 // 乐佩琦, 单乡红, 林人端, 等. 中国动物志: 硬骨鱼纲 鲤形目 (下卷). 北京: 科学出版社, 2000: 273 – 390.
- [9] 曹文宣, 陈宜瑜, 武云飞, 等. 裂腹鱼类的起源和演化及其与青藏高原的隆起关系 // 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 青藏高原隆起的时代、幅度和形式问题. 北京: 科学出版社, 1981.
- [10] 祁得林, 郭松长, 赵新全. 青藏高原裸裂尻属鱼类两个疑难种的分子系统学. *动物学报*, 2006, 52(6): 1058 – 1066.
- [11] Qi D L, Li T P, Zhao X Q, et al. Mitochondrial cytochrome *b* sequence variation and phylogenetics of the highly specialized Schizothoracine Fishes (Teleostei: Cyprinidae) in the Qinghai-Tibet Plateau. *Biochemical Genetics*, 2006, 44(5/6): 270 – 285.
- [12] Qi D L, Guo S C, Zhao X Q, et al. Genetic diversity and historical population structure of *Schizopygopsis pylzovi* (Teleostei: Cyprinidae) in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Freshwater Biology*, 2007, 52(6): 1090 – 1104.
- [13] 祁得林, 晁燕, 郭松长, 等. 黄河裸裂尻鱼五种群 mtDNA 控制区的遗传结构. *动物学报*, 2008, 54(6): 972 – 980.
- [14] Zardoya R, Doadrio I. Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: systematic and biogeographical implications. *Proc Soc London B*, 1998, 265(1403): 1365 – 1372.
- [15] Burland T G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol Biol*, 2000, 132(1): 71 – 91.
- [16] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150 – 163.
- [17] Saitoh K, Sado T, Mayden R L, et al. Mitogenomic evolution and interrelationships of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): the first evidence toward resolution of higher-level relationships of the world's largest freshwater fish clade based on 59 whole mitogenome sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 2006, 63(6): 826 – 841.
- [18] Haltia T, Finel M, Harms N, et al. Deletion of the gene for subunit III leads to defective assembly of bacterial cytochrome oxidase. *EMBO J*, 1989, 8(12): 3571 – 3579.
- [19] Riistama S, Puustinen A, García-Horsman A, et al. Channelling of dioxygen into the respiratory enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1275(1/2): 1 – 4.
- [20] Irving D O, Watson K. Mitochondrial enzymes of tropical fish: a comparison with fish from cold-waters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1976, 54(1): 81 – 92.
- [21] Tschischka K, Abele D, Pörtner H O. Mitochondrial oxygen conformity and cold adaptation in the polychaete *Nereis pelagica* and the bivalve *Arctica islandica* from the Baltic and White Seas. *J Exp Biol*, 2000, 203: 3355 – 3368.