

草鱼(♀)×赤眼鳟(♂)F₁及其亲本*CAST*基因cDNA全长克隆与结构差异

李东放 李耀国 金生振 何美凤 肖调义

FULL-LENGTH cDNA CLONING AND STRUCTURAL DIFFERENCES OF THE *CAST* GENE FROM *CTENOPHARYNGODON IDELLUS* (♀), *SQUALIOBARBUS CURRICULUS* (♂) AND THEIR HYBRID F₁

LI Dong-Fang, LI Yao-Guo, JIN Sheng-Zhen, HE Mei-Feng, XIAO Tiao-Yi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2020.064>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

草鱼(♀)×赤眼鳟(♂)杂交F₁倍性分析和性腺发育特点

THE STUDY OF PLOIDY AND FERTILITY OF THE HYBRID F₁ OF *CTENOPHARYNGODON IDELLUS* ♀ × *SQUALIOBARBUS CURRICULUS* ♂

水生生物学报. 2018, 42(2): 313–322 <https://doi.org/10.7541/2018.040>

草鱼和翘嘴*fgfrhl-1*基因的克隆和表达分析

CLONE AND EXPRESSING ANALYSIS OF *FGFRHL-1* IN *CTENOPHARYNGODON IDELLUS* AND *CULTER ALBURNUS*

水生生物学报. 2019, 43(6): 1182–1188 <https://doi.org/10.7541/2019.139>

草鱼自噬相关基因*Beclin1*的克隆及其在MC-LR胁迫下的表达特征

CLONING OF *BECLIN1*, AN AUTOPHAGY GENE, AND IT' S EXPRESSION UNDER MICROCYSTIN-LR STRESS IN GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*)

水生生物学报. 2019, 43(3): 479–485 <https://doi.org/10.7541/2019.059>

“太湖鲂”及其亲本肌肉营养成分的分析与评价

ANALYSIS AND EVALUATION OF NUTRITIONAL COMPOSITION IN MUSCLE OF HYBRID F1 OF FEMALE *CULTER ALBURNUS* × MALE *MEGALOBrama TERMINALIS* AND ITS PARENT FISH

水生生物学报. 2019, 43(2): 388–394 <https://doi.org/10.7541/2019.048>

草鱼*cadm2b*基因的克隆及在成体组织中的表达分析

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSING ANALYSIS OF *CADM2B* IN ADULT TISSUES OF GRASS CARP, *CTENOPHARYNGODON IDELLUS*

水生生物学报. 2017, 41(1): 9–17 <https://doi.org/10.7541/2017.2>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2020.064

草鱼(♀)×赤眼鲮(♂) F₁及其亲本CAST基因cDNA全长克隆与结构差异

李东放¹ 李耀国^{1,2*} 金生振¹ 何美凤¹ 肖调义^{1,2*}

(1. 湖南农业大学湖南省特色水产资源利用工程技术研究中心, 长沙 410128;

2. 水产高效健康生产湖南省协同创新中心, 常德 415000)

摘要: 钙蛋白酶抑制蛋白(Calpastatin, CAST)在肌肉生长和肉质特征形成中发挥重要作用。为探究草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) (♀)×赤眼鲮(*Squaliobarbus curriculus*) (♂)正交F₁的肉质相关分子基础, 通过RACE(Rapid-amplification of cDNA ends)技术分别克隆了草鱼(♀)×赤眼鲮(♂) F₁及其亲本的CAST基因cDNA全长, 并利用生物信息学方法分析比较了三种鱼的CAST结构差异。结果表明: 草鱼(♀)、赤眼鲮(♂)及草鱼(♀)×赤眼鲮(♂) F₁的CAST基因cDNA全长分别为3036、3165和3086 bp, 编码901、893和904个氨基酸; 预测蛋白质分子量分别为93.72、92.77和94.02 kD; 推测的理论等电点分别为5.92、6.01和6.02。草鱼(♀)×赤眼鲮(♂) F₁ CAST与草鱼(♀)和赤眼鲮(♂)核苷酸序列相似性分别为94.52%和90%。三种CAST蛋白均包括4个含有典型七肽的钙蛋白酶抑制结构域。草鱼(♀)、赤眼鲮(♂)和F₁ CAST氨基酸残基中分别存在73、82和75个潜在的磷酸化修饰位点。蛋白三级结构分析显示草鱼(♀)、赤眼鲮(♂)和F₁ CAST中分别含有24、12和20个β-折叠, 且均呈链状结构。综合可知, F₁ CAST在序列相似度、磷酸化位点数、蛋白质结构及进化地位与草鱼(♀)均更接近。该研究结果为阐明草鱼(♀)×赤眼鲮(♂)正交F₁肉质形成机理提供了分子基础。

关键词: 草鱼; 赤眼鲮; 杂交F₁; CAST; 结构差异

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2020)03-0528-06

鱼类杂交一般指不同品种、品系、种、属、亚科等亲缘关系较远的个体之间的交配^[1], 其后代可获得杂种优势, 在鱼类育种工作中具有很大的利用价值^[2-5]。远缘杂交因亲本遗传差异明显大于近缘杂交, 其杂交子代性状具有更大的可塑性, 杂种优势往往表现更为明显^[6]。杂交子代在染色体和DNA水平上可以产生广泛的变异, 是杂种优势产生的基础^[7]。赤眼鲮俗称“野草鱼”, 与草鱼同属雅罗鱼亚科, 具有较强的抗病能力^[8]。已有研究表明, 正交F₁(草鱼♀×赤眼鲮♂)能正常存活, 且表现出优于草鱼的疾病抗性及其肌肉品质^[9]。

鱼类的肉质品质是评价其营养价值的重要指

标^[10, 11]。李迪等^[12]比较分析了草鱼(♀)、赤眼鲮(♂)及正交F₁的肉质基本特性, 发现正交F₁肌肉比父、母本弹性大、嫩度高, 肉质更坚韧。李伟等^[13]测定了草鱼、赤眼鲮及正交F₁背部肌肉的营养成分, 发现正交F₁表现出肌肉弹性大、嫩度高和蛋白质丰富等杂种优势。但正交F₁肉质特征的分子特性及遗传基础尚不明确。

蛋白酶系统参与肌原纤维降解过程, 通过钙离子调控肌原纤维蛋白的性质和比例而影响肉的硬度^[14]。作为蛋白酶系统中的重要功能分子和影响肉质嫩度的重要候选基因, 钙蛋白酶抑制蛋白(Calpastatin, CAST)可以特异性识别并抑制钙蛋白酶

收稿日期: 2019-05-16; 修订日期: 2019-09-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31572615); 国家自然科学基金青年项目(31802288); 中国博士后科学基金特别资助项目(2018T110833); 中国博士后科学基金(2017M612560); 湖南省自然科学基金(2019JJ50231); 湖南农业大学省级优秀博士学位论文培育基金(YB2018002); 湖南省研究生科研创新项目(CX2018B400)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31572615); the NSFC Youth Project (31802288); the Special Support Project of China Postdoctoral Science Foundation (2018T110833); the China Postdoctoral Science Foundation (2017M612560); the Natural Science Foundation of Hunan Province (2019JJ50231); Hunan Agricultural University Provincial Excellent Doctoral Dissertation Cultivation Fund (YB2018002); the Research and Innovation Project for Graduate Students in Hunan Province (CX2018B400)]

作者简介: 李东放(1996—), 男, 硕士研究生; 主要研究方向为水产遗传育种与繁殖。E-mail: dfl0927@163.com

通信作者: 李耀国(1986—), 主要研究方向为水产抗病遗传育种。E-mail: yaoguoliqkl@163.com; 肖调义(1964—), 主要研究方向为水生动物遗传育种。E-mail: tyxiao1128@163.com *共同通信作者

(Calpain, CAPN)的表达及自溶稳定性^[15]; 最终降低CAPN降解蛋白的速度, 有助于肌肉生长^[16]。目前已在鲤(*Cyprinus carpio*)^[17]中克隆和鉴定了CAST基因。该研究克隆了草鱼(♀)、赤眼鲟(♂)及其正交F₁ CAST基因的cDNA全长, 分析并比较三种鱼该基因和蛋白结构上的差异, 以期为正交F₁肉质的分子及遗传特征研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

该研究所用的健康草鱼、赤眼鲟及正交F₁(草鱼♀×赤眼鲟♂)均购于浏阳市北盛镇乌龙渔场, 所有试验鱼均为2018年5月繁育的个体, 平均体重(14.50±1.25) g, 购回后放于恒温水循环养殖系统28℃暂养1个月, 每箱放养草鱼、赤眼鲟及正交F₁各10尾, 每日按其体重的3%早、晚各投喂一次饲料。

1.2 RNA提取及cDNA合成

从养殖系统中选取健康草鱼、赤眼鲟及正交F₁各1尾, 分别取肌肉组织80 mg, 按总RNA提取试剂盒(Omega, 美国)说明提取总RNA, 用核酸蛋白仪检测总RNA的质量和浓度, 并用1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。取2 μg质量和完整性好的RNA(A₂₆₀/A₂₈₀值在1.8—2.2), 按第一链cDNA合成试剂盒(Fermentas, 美国)的说明合成cDNA模板, 用于全长cDNA序列中间片段的克隆。参照SMARTer RACE 5'/3' cDNA试剂盒(Clontech, 美国)说明书分别合成5'-RACE和3'-RACE cDNA模板, 用于5'/3' cDNA末端克隆。

1.3 CAST基因全长cDNA克隆

基于本课题组前期草鱼转录组测序所得CAST基因部分序列(共1779 bp)以及GenBank中草鱼CAST基因片段(登录号: JF825477.1), 用Oligo7.0软件设计草鱼CAST基因3'和5'端的特异性扩增引物(表1), 分别以合成的草鱼5'和3'-RACE cDNA为模板扩增对应的末端序列。PCR反应条件为94℃预变性5min; 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 60s, 共30个循环; 72℃延伸7min。将得到的目的片段PCR产物切胶回收, 克隆至pMD19-T载体, 挑取阳性克隆送武汉奥科鼎盛生物科技有限公司测序。赤眼鲟及正交F₁ CAST cDNA全长序列获取参考已得到的草鱼CAST cDNA序列, 使用Oligo7.0软件设计引物; 分别以赤眼鲟第一链cDNA及正交F₁ 第一链cDNA作为模板扩增中间序列; 赤眼鲟CAST与正交F₁ CAST 5'/3' cDNA末端序列的获取同草鱼。

1.4 CAST生物信息学分析

使用DNASar软件拼接获得cDNA序列, 利用

表1 本文所用的引物序列

Tab. 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'-3')	用途 Usage
ScCAST-F	TTCGTTTCAGCAGGC ATGTCC	扩增中间序列
ScCAST-R	CAATCTATCTGTTC CGCCCTT	扩增中间序列
F ₁ CAST-F	GGCACTTTACCATC ATCACAACC	扩增中间序列
F ₁ CAST-R	CAATCTATCTGTTC CGCCCTT	扩增中间序列
CiCAST5'-RACE	GCCTTAACATCAGG TGCTGCCACG	RACE PCR
CiCAST3'-RACE	CCCCTGTCCATCT GCTGCCACGACC	RACE PCR
ScCAST5'-RACE	ACCGTGAAGCCCTC CGCACCTGA	RACE PCR
ScCAST3'-RACE	AGATGCTGCCGAA CGAACATCGACT	RACE PCR
F ₁ CAST5'-RACE	CCGCCCTGTCCCGC CTAAAGCCAT	RACE PCR
F ₁ CAST3'-RACE	CTCTCTCCCGACAA GAACACCC	RACE PCR

注: Ci. 草鱼; Sc. 赤眼鲟; F₁. 草鱼(♀)×赤眼鲟(♂) F₁

Note: Ci. *Ctenopharyngodon idellus*; Sc. *Squaliobarbus curriculus*; F₁. progeny of *Ctenopharyngodon idellus* (♀) × *Squaliobarbus curriculus* (♂)

SMART (<https://smart.embl-heidelberg.de>)、SignalP 4.1 Server和ProtParam<https://web.expasy.org/prot-param>在线软件分析氨基酸理化性质、信号肽和蛋白质结构域等, 通过NetPhos 3.1 Server在线软件预测蛋白磷酸化位点。使用BLAST在线比对分析序列的相似性, 通过DNAMAN对CAST蛋白进行多序列比对; 应用MEGA 6.0软件中的邻接法构建CAST的系统发育树(分支可信度设为1000次自展检测); 使用I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu>) 和PYMOL软件对蛋白质三级结构进行分析。

2 结果

2.1 CAST cDNA全长序列分析

草鱼(♀)、赤眼鲟(♂)及其正交F₁的CAST cDNA全长序列已提交至GenBank, 获得序列登录号分别为KT780366.1、KU994884和KU994883。草鱼(♀)、赤眼鲟(♂)和正交F₁ CAST cDNA序列全长分别为3036、3165和3086 bp; 其5'端非编码区依次为104、118和136 bp, 开放阅读框分别为2706、2682和2715 bp, 3'端非编码区依次为226、365和235 bp; 分别编码901、893和904个氨基酸。利用Blast软件比对结果显示正交F₁与母本草鱼(♀) CAST cDNA全长序列的同源性为94.52%, 高于其与父本赤眼鲟(♂)的同源性(90%)。

2.2 CAST蛋白功能结构域分析

草鱼(♀)、赤眼鲟(♂)和正交F₁ CAST的推导蛋

白质分子质量分别为93.72、92.77和94.02 kD, 理论等电点依次为5.92、6.01和6.02。NetPhos3.1 Server预测草鱼(♀)、赤眼鳟(♂)及正交F₁ CAST蛋白氨基酸残基中潜在丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)和酪氨酸(Tyr)磷酸化修饰位点。结果表明, 草鱼(♀)、赤眼鳟(♂)和正交F₁ CAST氨基酸残基中分别潜在73个(Ser: 49, Thr: 23, Tyr: 1)、82个(Ser: 54, Thr: 26, Tyr: 2)和75个(Ser: 51, Thr: 23, Tyr: 1)磷酸化修饰位点。SMART软件分析结果显示, 草鱼(♀)、赤眼鳟(♂)及正交F₁均包含4个钙蛋白酶抑制结构域, 正交F₁与草鱼对应结构域的结构域排布更为相似(图1)。

使用I-TASSER和PYMOL软件预测了草鱼(♀)、赤眼鳟(♂)和正交F₁的CAST蛋白三级结构。预测的蛋白均由主要β-折叠和无规则卷曲结构组成, 草鱼(♀)、赤眼鳟(♂)和正交F₁ CAST分别拥有24、12和20个β-折叠, 在蛋白三级结构上正交F₁与草鱼更为相近(图2)。

2.3 CAST钙蛋白酶抑制结构域差异比对

以草鱼(♀)、赤眼鳟(♂)和正交F₁为核心对象, 选择金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、爪蟾(*Xenopus laevis*)、牛(*Bos taurus*)及眼镜王蛇(*Ophiophagus hannah*)作为参照, 通过DNAMAN软件对此9个物种CAST的4个钙蛋白酶抑制结构域进行多序。

鱼类CAST蛋白的4个钙蛋白酶抑制结构域中都包含一个保守的“Thr-Ile-Pro-Pro-X-Try-Arg”七肽序列(X代表任意氨基酸)。鱼类的七肽序列具有高度保守性, 哺乳类、两栖类和爬行类与鱼类七肽序列存在部分差异。草鱼(♀)、赤眼鳟(♂)和正交F₁的4个钙蛋白酶抑制结构域序列中均包含高度保守的七肽序列, 其中正交F₁与草鱼对应的4个七肽序列完全一致, 而与赤眼鳟第1和第4个钙蛋白酶抑制结构域序列中的七肽序列一致; 赤眼鳟第2和

第3个钙蛋白酶抑制结构域序列中的七肽序列与草鱼和正交F₁对应序列均存在1个氨基酸残基差异位点。

2.4 系统进化关系分析

对草鱼(♀)、赤眼鳟(♂)、正交F₁与不同分类地位物种的CAST进化关系进行分析(图3), 整个系统发育树可分为两个大支: 硬骨鱼类聚为一支, 鸟类、爬行类、两栖类和哺乳类聚为另一支。在硬骨鱼类中, 淡水鱼(如鲤、斑马鱼等)和海水硬骨鱼类(如巴丁鱼*Pangasianodon hypophthalmus*、虹鳟*Oncorhynchus mykiss*等)进化距离相对较远; 正交F₁和母本草鱼(♀)进化关系较其与父本赤眼鳟(♂)更近。

3 讨论

为了更深入地了解草鱼(♀)×赤眼鳟(♂)远缘杂交后代的肉质形成相关分子基础, 研究克隆获得了草鱼(♀)、赤眼鳟(♂)及正交F₁三种鱼的CAST cDNA全长序列, 并以此为基础进行了三种鱼CAST序列相似性、蛋白组成及修饰、功能结构域特征以及系统进化关系的比较。就CAST而言, 各种不同层面的结构分析结果均提示正交F₁与母本草鱼(♀)遗传信息更为接近。据此推测正交F₁与母本草鱼(♀)CAST蛋白结合Ca²⁺调节钙蛋白酶活性的功能可能更相近^[18]。

蛋白质磷酸化是由蛋白质激酶催化的磷酸基团转移反应, 是常见且重要的蛋白质翻译后修饰方式之一^[19], 亦是生物调节控制蛋白质活力和功能的有效途径^[20]。真核生物中主要在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸等氨基酸残基位点发生磷酸化修饰^[21]。该研究通过预测草鱼(♀)、赤眼鳟(♂)及正交F₁磷酸化修饰位点, 获知草鱼CAST蛋白共有73个磷酸化位点, 赤眼鳟共有82个磷酸化位点, 而正交F₁具有75个潜在磷酸化位点。正交F₁与草鱼(♀)的磷酸化

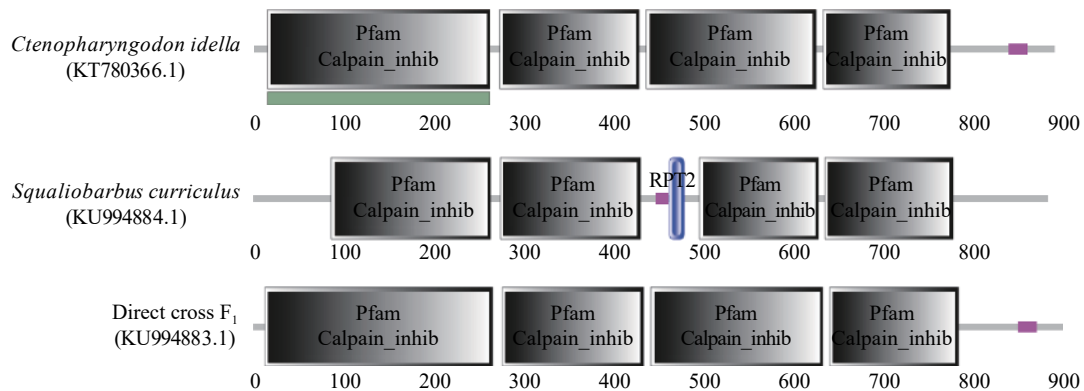


图1 CAST蛋白结构域分析

Fig. 1 Structural feature analysis of CAST proteins

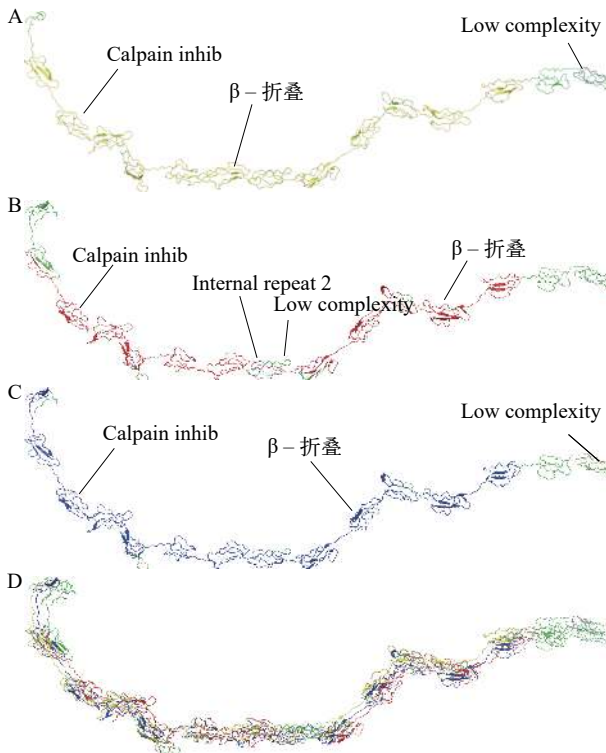


图2 CAST三级结构预测

Fig. 2 3D structure prediction of CAST

A、B、C和D分别表示草鱼(♀)、赤眼鲮(♂)、正交F₁和三种结果同一界面组合的三级结构预测图

The 3D structure prediction results of CiCAST, ScCAST, F₁ CAST and a combination of three 3D structures are represented by A, B, C and D, respectively

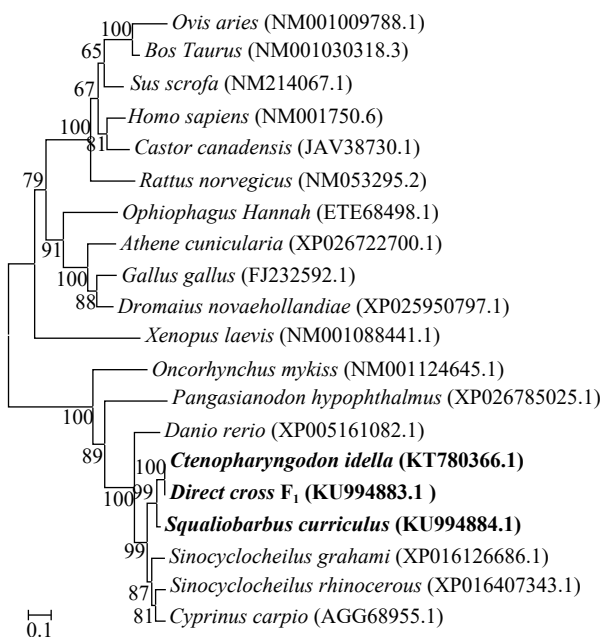


图3 CAST系统发育树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of CAST

位点相比仅相差2个丝氨酸磷酸化位点,而与赤眼鲮存在1—3个数量不等的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸位点差异。磷酸化修饰位点数量多少可以直接影响到蛋白质活性^[22, 23],因而三种鱼CAST蛋白的调节活性及功能可能存在差异。据此推测正交F₁ CAST蛋白活性与母本草鱼更相似,是偏向于受母本遗传信息影响的杂交种。

草鱼(♀)、赤眼鲮(♂)及正交F₁ CAST蛋白均具有4个典型的钙蛋白酶抑制结构域,与鲤^[17]等其他鱼类中CAST蛋白研究结果相一致。CAST 4个钙蛋白酶抑制结构域的任一结构域均能抑制一种CAPN蛋白活性,完整的CAST蛋白能够同时抑制4个CAPN蛋白分子^[24]。对不同物种钙蛋白酶抑制结构域的氨基酸残基序列分析发现,鱼类CAST蛋白的4个钙蛋白酶抑制结构域均各包含一个保守的“Thr-Ile-Pro-Pro-X-Try-Arg”七肽序列。该序列可能是CAST蛋白起抑制作用的关键部位,鱼类同哺乳类等该区域的差异可能导致CAST蛋白抑制CAPN的作用效果不同^[25—27]。该研究发现正交F₁与母本草鱼(♀)七肽位点序列完全一致,而与父本赤眼鲮(♂)存在部分位点的差异,预示正交F₁ CAST抑制CAPN的功能与草鱼更接近,而同赤眼鲮可能存在差异^[28]。此外,相对于哺乳动物而言,鱼类CAST蛋白缺少了L结构域;虽然此结构域的功能尚未明确,但可能是鱼类和哺乳类之间CAST序列同源性及功能差异形成的主要影响区域^[29]。本研究团队通过质构仪对正交F₁及其亲本的肉质进行了测定,研究结果显示正交F₁综合了双亲的优异肉质特性,呈现出弹性大,嫩度高,肉质坚韧等品质;亦分析过CAST在草鱼、赤眼鲮及其正交F₁肌肉中的表达量,结果显示正交F₁ CAST基因表达量与赤眼鲮无显著差异,而显著高于其母本草鱼^[12]。CAST基因表达量差异对肉质的影响有待深入研究。

4 结论

该研究首次获得了草鱼(♀)、赤眼鲮(♂)及正交F₁ CAST的cDNA全长序列,发现正交F₁ CAST在序列同源性、蛋白组成和修饰、功能结构域特征以及系统进化关系等方面与母本草鱼(♀)更为接近;表明正交F₁ CAST功能可能与母本草鱼(♀)更相似。所得数据为进一步解析钙蛋白酶系统在鱼肉品质形成过程中的作用提供了分子基础。

参考文献:

- [1] Wang S, Tang C C, Tao M, *et al.* Establishment and application of distant hybrid breeding technique for fish [J].

- Chinese Science: Life Sciences*, 2018(12): 1310-1329. [王石, 汤陈宸, 陶敏, 等. 鱼类远缘杂交育种技术的建立及应用 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2018(12): 1310-1329.]
- [2] Yang S, Lu M X, Huang Z H, *et al.* Comparison of growth-performance of five hybrid F₁ tilapia [J]. *Freshwater Fisheries*, 2006, **36**(4): 41-44. [杨淞, 卢迈新, 黄樟翰, 等. 5种杂交F₁罗非鱼生长性能比较研究 [J]. *淡水渔业*, 2006, **36**(4): 41-44.]
- [3] Graziania C, Morenoa C, Villarroela E. Hybridization between the freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) and *M. carcinus* (L.) [J]. *Aquaculture*, 2003, **217**(1-4): 81-91.
- [4] Yang H, Wu T T, Xia D Q. Comparative analysis of breeding effect among three crossed hybrid strains of *Oreochromis niloticus* and *O. aureus* [J]. *Scientific Fish Farming*, 2005(3): 18. [杨弘, 吴婷婷, 夏德全. 三种奥尼杂交罗非鱼养殖效果比较 [J]. *科学养鱼*, 2005(3): 18.]
- [5] Xiao W, Li D Y, Zou Z Y, *et al.* Preliminary study on fish identification of chromosomes in hybrids from cross between *Patinoptecten yessoensis* and *Chlamys farreri* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(5): 905-912. [肖炜, 李大宇, 邹芝英, 等. 四种杂交组合奥尼罗非鱼及其亲本的生长对比研究 [J]. *水生生物学报*, 2012, **36**(5): 905-912.]
- [6] Lou Y D, Li X Q. Studies on distant hybridization of Chinese fish and its application in aquaculture [J]. *Chinese Fisheries Science*, 2006, **13**(1): 151-158. [楼允东, 李小勤. 中国鱼类远缘杂交研究及其在水产养殖上的应用 [J]. *中国水产科学*, 2006, **13**(1): 151-158.]
- [7] Wan J F, Wang X L, Pan J. RAPD analysis of the genetic change in parent abalone and their hybrid [J]. *Journal of China Ocean University*, 2001, **31**(4): 506-512. [万俊芬, 汪小龙, 潘洁. 日本盘鲍×皱纹盘鲍子代杂种优势的RAPD分析 [J]. *中国海洋大学学报*, 2001, **31**(4): 506-512.]
- [8] Xiao T Y, Li W, Wang R H, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of Toll-like receptor 3 gene in barbel chub (*Squaliobarbus curriculus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(5): 894-901. [肖调义, 李伟, 王荣华, 等. 赤眼鲮Toll样受体3基因cDNA全长克隆及表达分析 [J]. *水生生物学报*, 2016, **40**(5): 894-901.]
- [9] Qiao Q, Liu Q L, Xiao T Y, *et al.* Hybrid F₁ ploidy analysis and gonadal development characteristics of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) × barbel chub (*Squaliobarbus curriculus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(2): 313-322. [乔庆, 刘巧林, 肖调义, 等. 草鱼(♀)×赤眼鲮(♂)杂交F₁倍性分析和性腺发育特点 [J]. *水生生物学报*, 2018, **42**(2): 313-322.]
- [10] Guo J L, Ma A J, Yue L, *et al.* Advances in breeding of fish resistance to stress [J]. *Marine Science*, 2013, **37**(10): 148-156. [郭建丽, 马爱军, 岳亮, 等. 鱼类抗逆性状选育研究进展 [J]. *海洋科学*, 2013, **37**(10): 148-156.]
- [11] Wang K. Studies on muscle quality and related candidate genes of culter in Xingkai Lake [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013: 3-4. [王琨. 兴凯湖翘嘴鲌肌肉品质及相关候选基因研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013: 3-4.]
- [12] Li D, Li W, Xiao T Y, *et al.* A comparative study on muscle characteristics of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) × barbel chub (*Squaliobarbus curriculus*) hybrid F₁ and its parents [J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2016, **39**(3): 28-33. [李迪, 李伟, 肖调义, 等. 草鱼(♀)×赤眼鲮(♂)杂交F₁与其亲本的肌肉特性比较研究 [J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2016, **39**(3): 28-33.]
- [13] Li W, Li D, Xiao T Y, *et al.* Comparison of muscular nutritional characteristics of grass carp, barbel chub and their hybrid F₁ generation [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2017, **43**(1): 52-57. [李伟, 李迪, 肖调义, 等. 草鱼和赤眼鲮及其正交F₁代的肌肉营养特性比较 [J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2017, **43**(1): 52-57.]
- [14] Fu X X, Wang Y, Li D Y, *et al.* Changes of physicochemical properties, tissue structure and protein properties of turbot muscle during evaporation [J]. *Food Science*, 2018, **39**(7): 56-62. [傅新鑫, 王垚, 李德阳, 等. 蒸制过程中大菱鲆肌肉理化特性、组织结构及蛋白特性变化 [J]. *食品科学*, 2018, **39**(7): 56-62.]
- [15] Xiao L. Cloning, tissue expression and bioinformatics analysis of chicken CAST gene cDNA [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2009: 8-9. [肖蕊. 鸡CAST基因cDNA的克隆、组织表达及其生物信息学分析 [D]. 成都: 四川农业大学, 2009: 8-9.]
- [16] Wang J, Elzo M A, Jia X, *et al.* Calpastatin gene polymorphism is associated with rabbit meat quality traits [J]. *Journal of Applied Animal Research*, 2016, **45**(1): 1-4.
- [17] Chen W X. Cloning and expression of calpain gene family and its correlation with muscle texture in *Cyprinus carpio* [D]. Harbin: Harbin University of Technology, 2016: 34. [陈伟兴. 鲤钙蛋白酶基因家族克隆表达及与肌肉质构相关性研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016: 34.]
- [18] Chen S Y, Bai Y M, Bao Q, *et al.* Structure and function of chicken Nrf2 protein and analysis of its binding ligand [J]. *Heilongjiang Livestock and Veterinary Medicine*, 2017, (3): 41-42. [陈思颖, 白雨曼, 包强, 等. 鸡Nrf2蛋白结构与功能及结合配体的分析 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017, (3): 41-42.]
- [19] Yao H. Advances in the study of animal calpain systems [J]. *Hubei Animal Husbandry Veterinary*, 2014, (2): 81-84. [姚慧. 动物钙蛋白酶系统的研究进展 [J]. *湖北畜牧兽医*, 2014, (2): 81-84.]
- [20] Jiang Z, Wang F, He X, *et al.* Progress in protein phosphorylation modification [J]. *Biotechnology Newsletter*, 2009, **20**(2): 233-237. [姜铮, 王芳, 何湘, 等. 蛋白质磷酸化修饰的研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2009, **20**(2):

- 233-237.]
- [21] Grimsrud P A, Swaney D L, Wenger C D, *et al.* Phosphoproteomics for the Masses [J]. *ACS Chemical Biology*, 2010, **5**(1): 105-119.
- [22] Zhang Q, Yang Z, An X L, *et al.* Phosphorylation modification of proteins and its research methods [J]. *Journal of Capital Normal University (Natural Science)*, 2006, **27**(6): 43-47. [张倩, 杨振, 安学丽, 等. 蛋白质的磷酸化修饰及其研究方法 [J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2006, **27**(6): 43-47.]
- [23] Liu Y J. Studies on salt-tolerance related genes of orange tilapia mozambicans, *Oreochromis canadensis* and their reciprocal progenies [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014: 43-44. [刘玉姣. 橙色莫桑比克罗非鱼、荷那龙罗非鱼及其正反交子代耐盐相关基因的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2014: 43-44.]
- [24] Ciobanu D C, Bastiaansen J, Lonergan S M, *et al.* New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs [J]. *Journal of Animal Science*, 2004, **82**(10): 2829.
- [25] Xu Z R, Hu C H, Li W F. The structure, activity regulation of the calpain system and its role in skeletal muscle growth [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry*, 2002, **38**(2): 44-45. [许梓荣, 胡彩虹, 李卫芬. 钙蛋白酶系统的结构、活性调节及其在骨骼肌生长中的作用 [J]. 中国畜牧杂志, 2002, **38**(2): 44-45.]
- [26] Shen X L, He Y M, He X L, *et al.* Research progress on calpastatin system [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2012, **33**(Z1): 35-36, 56. [申晓亮, 何永梅, 贺晓丽, 等. 钙蛋白酶系统研究进展 [J]. 畜牧与饲料科学, 2012, **33**(Z1): 35-36, 56.]
- [27] Hanna R A, Garcia-Diaz B E, Davies P L. Calpastatin simultaneously binds four calpains with different kinetic constants [J]. *FEBS Letters*, 2007(581): 2894-2898.
- [28] Zhai F, Zhang Y. Correlation between calpain inhibitor protein and meat tenderness [J]. *Chinese Feed*, 2007(16): 11-12. [翟峰, 张勇. 钙蛋白酶抑制蛋白与肉嫩度相关性 [J]. 中国饲料, 2007(16): 11-12.]
- [29] Wu C F, Wang R, Liang Q, *et al.* Dissecting the M phase specific phosphorylation of serine-proline or threonine-proline motifs [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, **21**(9): 1470-1481.

FULL-LENGTH cDNA CLONING AND STRUCTURAL DIFFERENCES OF THE CAST GENE FROM *CTENOPHARYNGODON IDELLUS* (♀), *SQUALIOBARBUS CURRICULUS* (♂) AND THEIR HYBRID F₁

LI Dong-Fang¹, LI Yao-Guo^{1,2}, JIN Sheng-Zhen¹, HE Mei-Feng¹ and XIAO Tiao-Yi^{1,2}

(1. Hunan Engineering Technology Research Center of Featured Aquatic Resources Utilization, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Collaborative Innovation Center for Efficient and Health Production of Fisheries in Hunan Province, Changde 415000, China)

Abstract: Calpastatin plays an important role in muscle growth and meat quality formation. To investigate the molecular basis of the meat quality of hybrid F₁ from *Ctenopharyngodon idellus* (♀) × *Squaliobarbus curriculus* (♂), the full-length cDNAs of *CiCAST*, *ScCAST* and their hybrid F₁ *CAST* were cloned by using RACE technology, and structure differences were analyzed by bioinformatics tools in this study. The results showed that the full-length cDNA of *CiCAST*, *ScCAST* and hybrid F₁ *CAST* were 3036, 3165 and 3086 bp in length and encoded 901, 893 and 904 amino acids, respectively; the predicted molecular weights were 93.72, 92.77 and 94.02 kDa, and the theoretical isoelectric points were 5.92, 6.01 and 6.02, respectively. The nucleotide sequence similarity of *CAST* between F₁ *CAST* and *CiCAST* was 94.52% and was 90% between F₁ *CAST* and *ScCAST*. The three *CAST* proteins contained four typical calpain inhibitory domains, which had typical heptapeptide structures. A prediction of the phosphorylation sites showed that there were 73, 82 and 75 potential phosphorylation modification sites in the amino acid residues of *CiCAST*, *ScCAST* and F₁*CAST*, respectively. The *CAST* tertiary structure analysis showed that *CiCAST*, *ScCAST* and F₁*CAST* contained 24, 12 and 20 β-folds, which were all formed into β-chain structures. It was concluded that F₁ *CAST* was more similar to *CiCAST* in sequence similarity, number of phosphorylation sites, protein structure and evolutionary status. The results provide a molecular basis for the elucidation of meat quality formation in hybrid F₁ fish.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; *Squaliobarbus curriculus*; Hybrid F₁; *CAST*; Structural differences