

引文格式: 荣华, 凌钰, 豆腾飞, 等. 浅色黄姑鱼 I 型胶原蛋白 $\alpha 2$ (COL1A2) 基因的克隆及表达分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(5): 786–794. DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202111079

浅色黄姑鱼 I 型胶原蛋白 $\alpha 2$ (COL1A2) 基因的克隆及表达分析*

荣 华¹, 凌 钰², 豆腾飞², 黄 英², 王晓雯², 孔令富², 毕保良², 王金浩^{3**}

(1. 襄阳职业技术学院 农学院, 湖北 襄阳 441050; 2. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201;
3. 云南华衡检测技术有限公司, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】通过克隆浅色黄姑鱼 (*Nibea coibor*) I 型胶原蛋白 $\alpha 2$ (COL1A2) 基因, 分析其分子特征、组织分布及表达差异, 为鱼类胶原蛋白代谢机制研究奠定理论基础。【方法】通过 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术获得浅色黄姑鱼 COL1A2 基因全长序列, 利用生物信息学分析方法对其进行系统分析, 探讨其分子特征及组织表达谱。【结果】COL1A2 cDNA 序列长 5 826 bp, 编码 1 352 个氨基酸。BLAST 同源性比对和系统进化树分析表明: 浅色黄姑鱼与大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 同属石首鱼科 (Sciaenidae), 亲缘关系最近, 且两者 COL1A2 的氨基酸序列同源性最高 (96.60%)。生物信息学分析显示: COL1A2 多肽链包含脊椎动物 I 型胶原蛋白的所有特征, 如相同的信号肽、C-前肽和 N-前肽结构域以及三重螺旋结构域等。qRT-PCR 结果显示: 鱼鳔中 COL1A2 基因的表达显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 且胶原蛋白在不同组织中的分布规律与其一致。【结论】本研究首次克隆了浅色黄姑鱼 COL1A2 基因 (GenBank 登录号: MK641513), 该基因的组织表达特异性是引起胶原蛋白差异化沉积的原因之一。研究结果有助于深入探究胶原蛋白的生物合成途径及调控机制。

关键词: 浅色黄姑鱼; COL1A2; cDNA 克隆; 表达分析; 组织分布

中图分类号: Q959.483

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2023) 05-0786-09

Cloning and mRNA Expression Analysis of Type I Collagen Alpha 2 Gene from Chu's Croaker (*Nibea coibor*)

RONG Hua¹, LING Yu², DOU Tengfei², HUANG Ying², WANG Xiaowen²,
KONG Lingfu², BI Baoliang², WANG Jinhao³

(1. College of Agriculture, Xiangyang Polytechnic, Xiangyang 441050, China; 2. Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. Yunnan Huaheng Testing Technology Co., Ltd., Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] This study cloned cDNA of COL1A2 gene from *Nibea coibor*, analyzed the molecular characteristics, tissue distribution and expression of collagen, to lay a theoretical founda-

收稿日期: 2021-12-03

修回日期: 2023-09-06

网络首发日期: 2023-10-11

*基金项目: 云南省基础研究计划面上项目 (202201AT070251); 云南省重大科技专项计划项目 (202202AE090018); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2021A1515110179); 湖北省自然科学基金一般面上项目 (2023AFB1016)。

作者简介: 荣华 (1986—), 男, 湖北荆州人, 博士, 实验师, 主要从事水产动物营养研究。

E-mail: 15hrong@stu.edu.cn

**通信作者 Corresponding author: 王金浩 (1980—), 男, 辽宁抚顺人, 硕士, 工程师, 主要从事食品科学研究。E-mail: 43322603@qq.com

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20231009.0750.002>



tion for the study of collagen metabolism mechanism in fish. [Methods] The full-length sequence of COL1A2 gene of *N. coibor* was obtained through rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology, and then systematically analyzed using bioinformatics analysis method to explore its molecular characteristics and tissue expression. [Results] The COL1A2 cDNA was 5 826 bp in full-length and encoded a polypeptide of 1 352 amino acids. BLAST homology comparison and phylogenetic tree analysis revealed that the *N. coibor* and *Larimichthys crocea* should belong to Sciaenidae, having the closest relatives, and the amino acid sequence homology of COL1A2 was the highest (96.60%). Bioinformatics analysis showed that COL1A2 contained all the characteristics of type I collagen in vertebrates identified, such as the same signal peptides, C-propeptide and N-propeptide domains, triple helix domains and so on. qRT-PCR results showed that the expression level of COL1A2 in the swim bladder of *N. coibor* was significantly higher than that in other tissues ($P < 0.05$). It was consistent with the distribution pattern of collagen in different tissues. [Conclusion] The COL1A2 gene of *N. coibor* (GenBank accession number: MK641513) is cloned for the first time. The tissue expression specificity of this gene is one of the reasons for the differential depositon of collagen. The results of the study will help to further study the collagen biosynthetic pathway and regulation mechanism in *N. coibor*.

Keywords: *Nibea coibor*; COL1A2; cDNA cloning; mRNA expression; tissue distribution

胶原蛋白是一簇具有三重螺旋结构、白色透明、无分支的原纤维细胞外基质蛋白, 主要存在于脊椎动物的肉和结缔组织中, 是与各组织、器官功能有关的结构蛋白质, 起着支撑器官、保护机体的功能^[1]。胶原蛋白是一个庞大的家族, 种类繁多, 结构高度复杂, 从分子结构、超分子结构, 到组织分布和功能等, 都具有显著的多样性^[2]。截至目前, 通过分子生物学和基因克隆等手段对不同类型的胶原蛋白进行克隆、分离和鉴定, 已鉴定出 28 种新型胶原蛋白^[3-4]。在胶原蛋白家族成员中, I 型胶原蛋白在脊椎动物中的分布最广泛, 出现在从海绵到人类的各种组织中^[3, 5-6]。已有研究从卡特拉鱼 (*Catla catla*)、麦瑞加拉鲮鱼 (*Cirrhinus mrigala*)^[7]、红古鱼 (*Sciaenops ocellatus*)^[8] 和罗非鱼 (*Oreochromis* sp.)^[9] 中分离并鉴定了不同类型的胶原蛋白。这表明胶原蛋白在所有多细胞动物中都是保守的。据研究报道: I 型胶原蛋白由 2 条 $\alpha 1$ 和 1 条 $\alpha 2$ 多肽链组成, 分别由 I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ (COL1A1) 和 I 型胶原蛋白 $\alpha 2$ (COL1A2) 基因编码^[10]。许多硬骨鱼的 I 型胶原蛋白前体 α 链基因也相继被报道, 如虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[11]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[12]、斑鲳 (*Raja kenjoi*)^[13] 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)^[10, 14] 等。

浅色黄姑鱼 (*Nibea coibor*) 俗名白奈、金丝,

隶属于鲈形目 (Perciformes) 石首鱼科 (Sciaenidae) 黄姑鱼属 (*Nibea*), 该鱼具有较大的鱼鳔, 且富含胶原蛋白的鱼鳔干制品 (鱼胶) 是加工价值较高的水产食用珍品, 在市场上供不应求 (目前优质白奈鱼胶市场价格为 10 000~15 000 元/kg)^[15-18]。然而, 关于浅色黄姑鱼胶原蛋白的研究鲜有报道。课题组前期研究发现: 饲料中添加羟脯氨酸和脯氨酸可以上调 COL1A1 和 COL1A2 基因的表达, 并促进浅色黄姑鱼鱼鳔中胶原蛋白沉积^[19-20], 但对 I 型胶原蛋白前体 α 链基因的分子结构及其调控机制缺乏深入探讨。本研究首次克隆了浅色黄姑鱼 COL1A2 基因, 分析其结构和功能, 并对其鱼鳔等 8 个组织中胶原蛋白的分布及 COL1A2 mRNA 在不同组织中的表达谱进行了分析, 以期为进一步探讨胶原蛋白代谢的分子机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2018 年 11 月在汕头大学南澳试验站采集了 6 尾浅色黄姑鱼, 进行组织样品 (肝脏、肌肉、小肠、鱼鳔、鱼皮、鱼鳞、鳍条和脊柱) 的采样, 1 份样品在液氮中速冻, 存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 直至开展基因克隆及表达分析; 另外 1 份样品存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,

用于开展胶原蛋白含量的测定。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第 1 链的合成

根据 Trizol (Invitrogen, USA) 试剂说明书, 使用氯仿—异丙醇法提取肌肉组织中的总 RNA, 通过 1.2% 琼脂糖凝胶分析确定其完整性和质量, 利用 Nanodrop®ND-2000 分光光度计 (Thermo Scientific NanoDrop, USA) 测定 260 nm/280 nm 处的吸光度, 确定 RNA 的最终浓度。按照 cDNA Synthesis Super-Mix Kit (Trans Gen, 北京) 说明书将总 RNA 反转录成 cDNA, cDNA 样本存储在 -20 ℃ 用于 qRT-PCR 分析。按照 SMARTer RACE

cDNA Amplification Kit 说明书 (Clontech, USA) 合成 cDNA 第 1 链, 产物存于 -20 ℃, 用于 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 克隆。

1.3 引物设计

根据 NCBI 上检索大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) 和鲈鱼 (*Micropterus salmoides*) 等的 *COL1A2* cDNA 序列保守区, 利用 Primer Premier 5.0 软件 (Premier Biosoft International, USA) 设计目的基因的特异性引物 (表 1)。

表 1 *COL1A2* 基因克隆及表达分析所需引物序列的信息

Tab. 1 Primer sequence information used for the cDNA cloning and expression analysis of *COL1A2*

用途 use	基因名称 gene name	引物编号 primer number	引物序列 (5'→3') primer sequence
RACE-PCR	<i>COL1A2</i>	R1-C1A2F	GTCTTCAGGGATTCGTTGGT
		R1-C1A2R	GGCGAGATGGTTTATTGTTC
		R2-C1A2F	GGATTCTGTTGCTGCTTGC
		R2-C1A2R	AGGTCCTGTTCTCCCTTCT
		R3-C1A2F	GAGTTGTTGGTAATGCTGGTGA
		R3-C1A2R	GTGTTGAGGGACTTGATGGTG
5'/3'RACE	<i>COL1A2</i>	C1A2-51	CCCGATTGACATGATGCTAGGTATGAA
		C1A2-52	CCAACATTGCCGTCAGCACCAC
		C1A2-31	AGTCCCTCAACACTCAGATCGAGAACCT
		C1A2-32	GGCAACAGCCGCTTCACCTTCT
qRT-PCR	<i>COL1A2</i>	Q-COL1A2F	CAAGAACAGCGTTGCCTACAT
		Q-COL1A2R	ACGGAGAAGGTGAAGCGG
	<i>β-actin</i>	β-actinF	GGTTACTCCTTACCACCACAG
		β-actinR	TCCGTCGGGCAGCTCATA
cDNA synthesis		Oligo-	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACXXXXX
RACE-PCR		UPM (long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
		UPM (short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC
		NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
PCR screening		M13F	GTA AACGACG GGC CAGT
		M13R	ACAGGAAACAGCTATGAC

注: “X”代表专利SMARTer Oligo序列中未公开的碱基。
Note: “X” represents the undisclosed base in the proprietary SMARTer Oligo sequence.

1.4 浅色黄姑鱼 *COL1A2* 基因核心片段克隆

根据引物序列及克隆策略, 以浅色黄姑鱼肌肉的 cDNA 为模板, 采用应用生物系统 Veriti™ 热循环仪 (Thermo Fisher Scientific, USA) 进行聚合酶链式反应 (PCR), 扩增目的基因 DNA 片段。PCR 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳中确认大小, 切胶回收与预期片段大小相符的产物, 操作步骤依据 DNA 切胶回收试剂盒说明书。将回收得到的 DNA 片段与 pMD19-T 载体连接, 操作步

骤参照 Takara pMD 19-T Vector Cloning Kit 说明书 (Takara), 再转至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 筛选阳性克隆送至北京华大基因组研究所 (深圳) 测序, 所得的 cDNA 序列在 NCBI 上进行 BLAST 同源性分析。

1.5 浅色黄姑鱼 *COL1A2* 基因 cDNA 末端快速扩增 (RACE)

根据已有基因序列设计 5'和 3' RACE 反应的基因特异性引物 (表 1), 按照 SMARTer RACE

cDNA Amplification Kit (Clontech) 操作说明书制备 5' RACE-Ready cDNA 和 3' RACE-Ready cDNA 模板。RACE-PCR 分为 2 轮 PCR, 第 1 轮为 Touch-down PCR, 第 2 轮为 Nest PCR, 具体扩增方法和体系按照 SMARTer RACE 5'/3' Kit (Takara) 说明书进行。取 PCR 扩增产物 5 μ L 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收目的条带, 将连接和转化后得到的阳性克隆送至北京华大基因组研究所 (深圳) 测序。

1.6 生物信息学分析

采用 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上的 BLAST 工具对克隆到的部分核心序列、3' RACE 序列和 5' RACE 序列进行同源性比对; 采用 DNAMAN 拼接序列并使用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>) 预测全长序列的开放阅读框; 采用 Compute pI/Mw tool (http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html) 预测蛋白质序列等电点和分子量; 采用 PROTPARAM (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白的理化性质; 采用 PROTSKALE (<http://web.expasy.org/protscale/>) 在线测定蛋白质的疏水性; 采用 PREDICT PROTEIN 软件 (<https://www.predictprotein.org/>) 在线预测蛋白质的二级结构; 采用 PROSITE 在线软件 (<http://prosite.expasy.org/>) 预测蛋白的结构和功能域; 采用 ClustalX2 软件进行多序列比对, 再用 MEGA 4.0 构建系统发育树。

1.7 不同组织中 COL1A2 基因的表达分析

根据已克隆的 COL1A2 全长 cDNA 序列设计 1 对 qRT-PCR 特异引物, 并以 β -actin 基因为内参 (表 1)。按照试剂盒说明书, 采用实时荧光定量 PCR 仪 (Roche Light Cycler[®] 480 System, 瑞士) 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析。使用 $\Delta\Delta C_t$ 相对量化计算方法进行基因表达量分析, 使用内参基因 (β -actin) 进行归一化处理, 具体为: 取 3 个样本, 每个样本一式三份用于计算平均 C_t , $\Delta C_t = C_{t\text{目标基因}} - C_{t\text{内参基因}}$; $\Delta\Delta C_t = \text{每个样本处理组 } \Delta C_t / \text{控制组 } \Delta C_t$ (试验参考); 相对量化的表达式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示为目标基因处理组与控制组的相对表达量。

1.8 不同组织中胶原蛋白含量的测定

由于羟脯氨酸几乎只存在于胶原蛋白中, 且因胶原蛋白结构的特殊性, 羟脯氨酸在胶原蛋白中的含量相对固定为 12.5%, 故常用羟脯氨酸的

含量计算组织中胶原蛋白的含量。采用试剂盒 (Art. No. A030-2, 南京建成生物工程研究所, 中国南京) 对样品进行处理, 操作方法参考制造商说明书; 使用 Infinite[®] Pro 200 酶标仪 (Tecan, 瑞士) 分析样品, 测定波长 550 nm 处的吸光度。由标准品根据公式计算得到羟脯氨酸含量; 胶原蛋白含量由羟脯氨酸含量乘以 8 估算得到^[21]。

2 结果与分析

2.1 COL1A2 基因的 cDNA 和氨基酸序列

从浅色黄姑鱼中克隆到 I 型胶原蛋白 $\alpha 2$ 基因 (COL1A2), 并提交至 NCBI (GenBank 登录号: MK641513)。COL1A2 基因的 cDNA 全长 5 826 bp, 包括 3' 非翻译区 1 657 bp, 5' 非翻译区 113 bp 和开放阅读框 4 056 bp, 共编码 1 352 个氨基酸。通过蛋白质结构和疏水性分析预测 COL1A2 基因蛋白质分子量为 126.74 ku, 等电点为 9.24, 其中带负电荷残基总数 (Asp+Glu) 为 106, 带正电残基总数 (Arg+Lys) 为 121。计算得到脂质指数为 39.70, 亲水性的总体均值为 -0.713, 失稳指数为 22.67, 蛋白质稳定。

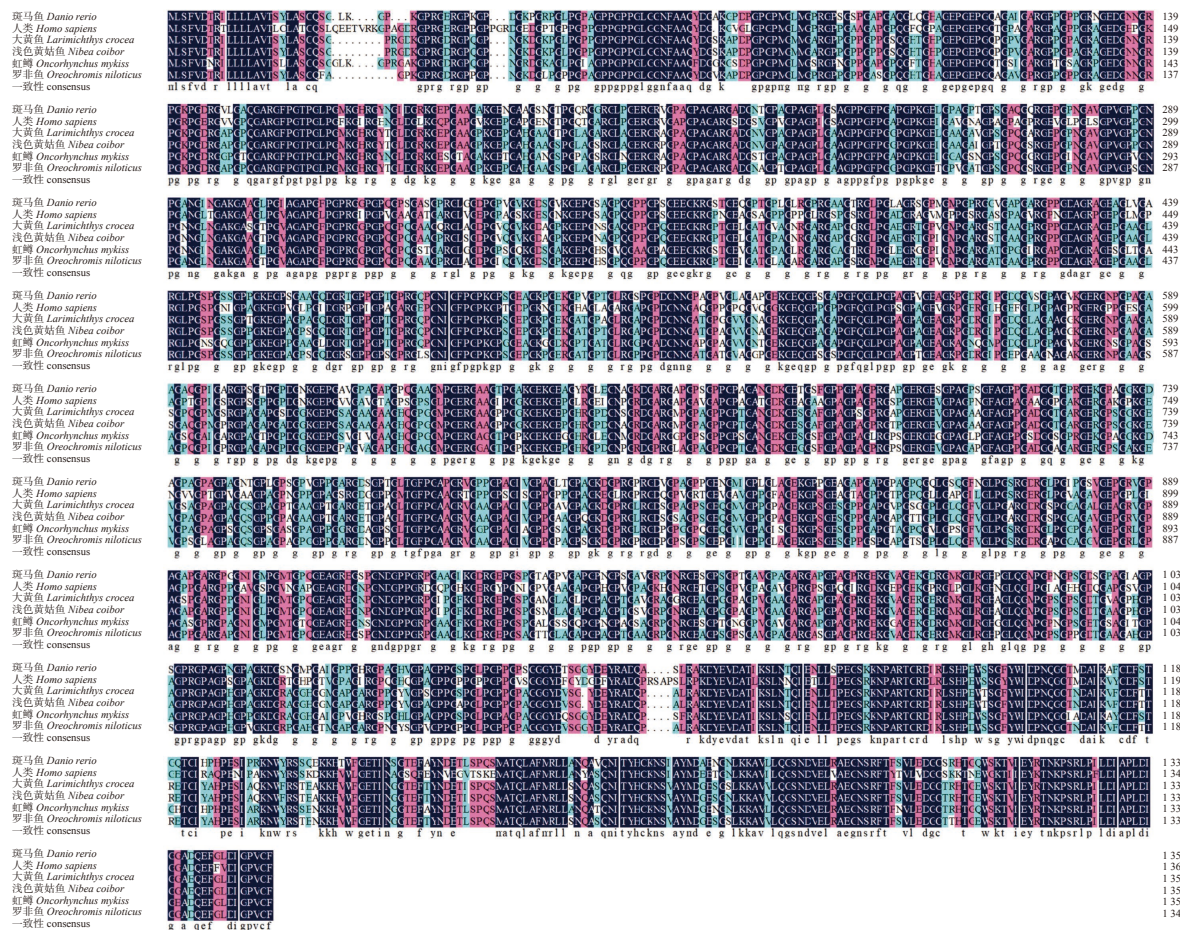
通过对蛋白质的结构域和功能预测, 观察到 COL1A2 原纤维胶原蛋白 N-前肽信号肽的裂解位点 (1~24)、三重螺旋结构域 (71~834) 和 NC1 结构域 (847~1 351)。还发现 COL1A2 蛋白含有 24 个氨基酸信号肽, 位于 M1~S24 区域 (MLS-FVDTRILLLLAVTSYLASCQS)。此外, 还预测了 COL1A2 蛋白三重螺旋结构域, 在螺旋区观察到 19 个甘氨酸—脯氨酸—脯氨酸 (GPP) 重复位点、2 个精氨酸—甘氨酸—天冬氨酸 (RGD) 细胞黏附位点和 2 个分子内部耦合点 (GMKGHR, GMKGLR), COL1A2 多肽还在链内或链间形成 7 个位点的 C-propeptide 二硫化物键、1 个糖基结合站点 (NIT) 和 1 个磷酸化 (KRGP) 位点。

2.2 COL1A2 氨基酸序列的多序列比对和进化树

由表 2 可知: 浅色黄姑鱼 COL1A2 氨基酸序列具有较高的保守性, 与其他鱼种之间的相似性均大于 80%, 且浅色黄姑鱼 COL1A2 的氨基酸序列与大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 的相似度最高, 达到 96.60%。多序列比对结果 (图 1) 显示: 浅色黄姑鱼 COL1A2 与大黄鱼 (XP_027142672.1) 相似度最高, 与人类 *Homo sapiens* (NP_892013.2)

Tab. 2 COL1A2 polypeptide sequence identity of *Nibea coibor* with other fishes

种名 species name	基因登录号 accession number of gene	相似度/% identity	种名 species name	基因登录号 accession number of gene	相似度/% identity
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	XP_027142672.1	96.60	罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	NP_001269826.1	88.76
黑点青鲮 <i>Oryzias melastigma</i>	XP_024154448.1	88.13	美妊丽鱼 <i>Astatotilapia calliptera</i>	XP_026011889.1	88.47
半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	XP_008328838.1	90.32	半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	XP_008329548.1	89.13
高体鲷 <i>Seriola dumerili</i>	XP_022602721.1	91.94	龟壳攀鲈 <i>Anabas testudineus</i>	XP_026203436.1	91.42
卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	ATI25517.1	92.09	眼斑海葵鱼 <i>Amphiprion ocellaris</i>	XP_023133230.1	91.86
青鲮 <i>Oryzias latipes</i>	XP_023815576.1	87.61	多刺棘光鳃鲷 <i>Acanthochromis polyacanthus</i>	XP_022069293.1	91.57
电鳗 <i>Electrophorus electricus</i>	XP_026867852.1	81.73	红树林鲷鱼 <i>Kryptolebias marmoratus</i>	XP_017279795.1	88.09
弹涂鱼 <i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	XP_020795826.1	85.59	大刺鲃 <i>Mastacembelus armatus</i>	XP_026155865.1	89.74
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	ADK48763.1	82.17	花斑剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	XP_023200744.1	87.56
白鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	AUF74474.1	82.10	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	NP_001117679.1	81.42
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_892013.2	81.21	大鳞大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	XP_024296660.1	81.36
银大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus kisutch</i>	XP_020360620.1	81.29	黑龙江大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus keta</i>	BAB79229.1	81.80
兰副双边鱼 <i>Parambassis ranga</i>	XP_028284246.1	90.90	鲫鱼 <i>Carassius auratus</i>	XP_026144583.1	82.69
底鲮 <i>Fundulus heteroclitus</i>	XP_012707154.1	85.21	巴丁鱼 <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	XP_026785766.1	82.10
贝尔湖红点鲑 <i>Salvelinus alpinus</i>	XP_023991358.1	80.18	墨西哥脂鲤 <i>Astyanax mexicanus</i>	XP_022538957.1	82.32



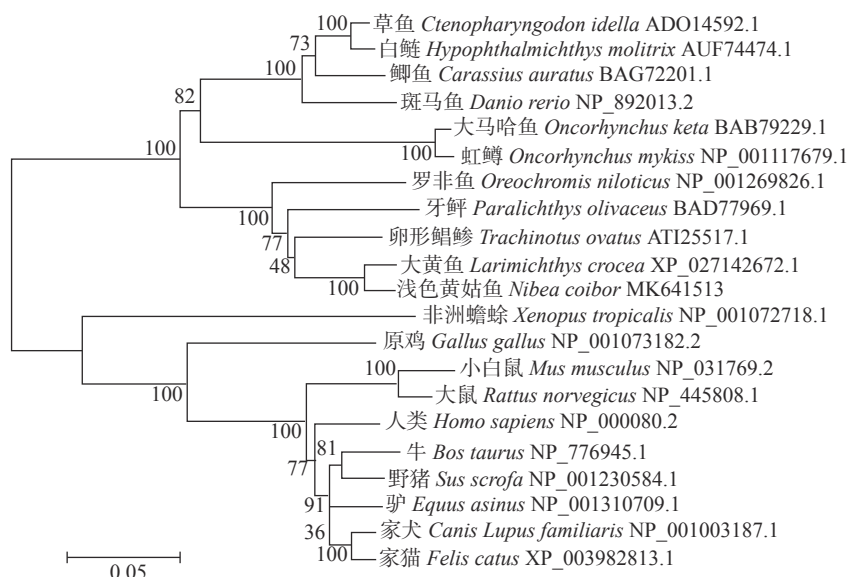
Note: The high, medium and low conserved amino acid residues are shown in black, red and green shadows, respectively; the black dotted lines represent intervals.

Fig. 1 Amino acid sequences of COL1A2 in *Nibea coibor* and other species

相似度最低。进一步分析发现: 整个原纤维胶原 NC1 结构域在所有物种中都具有较高的相似度, 而 COL1A2 的肽链裂解位点存在一定的差异。

由图 2 可知: COL1A2 进化树形成 2 个明显的分支, 第 1 支主要是硬骨鱼类, 包括草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、白鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、鲫鱼 (*Carassius auratus*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、浅色黄

姑鱼 (*N. coibor*)、卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 和牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*); 第 2 支为高等脊椎动物类, 包括原鸡 (*Gallus gallus*)、小白鼠 (*Mus musculus*)、大鼠 (*Rattus norvegicus*)、驴 (*Equus asinus*)、野猪 (*Sus scrofa*)、家犬 (*Canis lupus familiaris*)、家猫 (*Felis catus*)、家牛 (*Bos taurus*) 和人类 (*Homo sapiens*); 两栖类动物非洲蟾蜍 (*Xenopus tropicalis*) 处在 2 个分支之间, 并被归为第 2 支。可见, 浅色黄姑鱼与大黄鱼同属于石首鱼科, 亲缘关系最近。



注: 数字表示 1 000 次引导迭代后进化树拓扑所呈现的频率。水平分支长度与每个位点的氨基酸取代率成正比, 距离越短, 进化关系越近; 相反, 进化关系越远。

Note: Numbers represent the frequencies with which the tree topology presented is replicated after 1 000 bootstrap iterations. The horizontal branch length is proportional to amino acid substitution rate per site, the shorter the distance, the closer the evolutionary relationship; conversely, the evolutionary relationship is the farther.

图 2 浅色黄姑鱼和其他物种 COL1A2 蛋白质系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of COL1A2 from *N. coibor* and other species

2.3 浅色黄姑鱼 COL1A2 基因在不同组织中的表达

由图 3 可知: COL1A2 基因在鱼鳔中的表达显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 其次是脊柱、皮肤和鱼鳞, 而肝脏和鳍条中的 COL1A2 表达量相对较低, 小肠中 COL1A2 基因表达量最低, 且显著低于除肝脏和鳍条外的其他组织 ($P < 0.05$)。

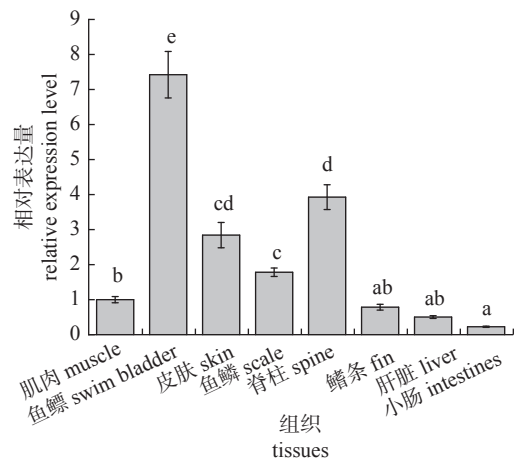
2.4 胶原蛋白组织分布的特异性

由表 3 可知: 鱼鳔中的胶原蛋白含量最高, 其次是脊柱、鱼鳞和皮肤, 肝、肠、肌肉和鳍条中胶原蛋白含量相对较少, 且各组织中的胶原蛋白含量均有显著差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 浅色黄姑鱼 COL1A2 基因序列

I 型胶原蛋白是脊椎动物细胞外基质的主要成分, 且在各类胶原中含量最多, 具有重要的生理和机械功能^[5]。本研究成功克隆到浅色黄姑鱼 COL1A2 完整的 cDNA 序列, 全长 5 826 bp, 包括 5'非编码区 113 bp、3'非编码区 1 657 bp 和开放阅读框 4 056 bp, 编码 1 352 个氨基酸, 与 YU 等^[10]对草鱼的研究结果相似。浅色黄姑鱼的 COL1A2 三重螺旋区拥有 19 个甘氨酸—脯氨酸—脯氨酸 (Gly-Pro-Pro) 重复肽, 和已有研究结果



注：不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Note: Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).
图 3 *COL1A2* 基因在浅色黄姑鱼不同组织中的表达分析
Fig. 3 Expression analysis of *COL1A2* gene in different tissues of *N. coibor*

表 3 不同组织中羟脯氨酸和胶原蛋白的含量
Tab. 3 Contents of hydroxyproline and collagen in different tissues of *N. coibor* g/kg

组织 tissue	羟脯氨酸 hydroxyproline	胶原蛋白 collagen
肌肉 muscle	1.42±0.02 b	11.35±0.15 c
鱼鳔 swim bladder	24.48±0.05 g	195.87±0.39 h
肝脏 liver	0.15±0.01 a	1.18±0.09 a
鱼鳞 scale	6.01±0.23 e	48.11±1.80 f
皮肤 skin	4.12±0.11 d	32.97±0.90 e
脊柱 spine	10.91±0.22 f	87.26±1.78 g
鳍条 fin	1.99±0.04 c	15.94±0.31 d
小肠 intestines	0.60±0.01 a	4.81±0.04 b

注：同列不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Note: In the same column, different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

类似，如海绵 COL1A2 三重螺旋区的 Gly-Pro-Pro 重复肽有 11 个^[22]，海胆有 12 个^[23]，草鱼有 23 个^[10]。研究表明：重复肽对皮肤和肌肉胶原蛋白的稳定性具有重要作用，且被广泛认为是冷血动物的特征^[24]。在三重螺旋结构域中还观察到 2 个交错耦合位点 (GMKGHR 和 GMKGLR) 以及 2 个精氨酸—甘氨酸—天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp) 细胞黏附位点，这些交错耦合域是维持胶原纤维物理化学性质和结构稳定的必要结构^[25]。Arg-Gly-Asp 序列被认为是三螺旋结构域的潜在细胞结合位点^[26-27]，在鳟鱼^[11]、斑马鱼^[28]和草鱼^[10]中也均有发现，表明浅色黄姑鱼 COL1A2 蛋白具有与这些鱼相似的稳定性和细胞亲和力。此外，

浅色黄姑鱼 COL1A2 的 C-前肽区发现 7 个二硫化物残基 (-cys-)。C-前肽参与细胞内形成胶原过程中的链选择和链缔合，在转运至细胞外基质的过程中可维持蛋白的可溶性，且 -cys- 主要参与形成跨链和链内的二硫桥，对维持胶原 α 链之间的相互作用具有重要意义^[29]。浅色黄姑鱼 COL1A2 的 C-前肽区还发现单一的天冬氨酸—异亮氨酸—苏氨酸 (Asn-Ile-Thr) 序列 (952~955)。Asn-X-Thr 具有潜在的碳水化合物附着功能，相似的结果在斑鳕中也有发现，其 COL1A1 蛋白序列的 C-前肽区具有单一的三肽 Asn-Ile-Thr 序列 (1364~1366)^[18]。综上所述，浅色黄姑鱼 COL1A2 原纤维胶原蛋白具有和其他鱼类相同的信号肽、C-前肽/N-前肽结构域和三重螺旋结构域，表明其蛋白质功能是保守的。

胶原蛋白是一类具有相似特征的庞大家族，该家族所有成员共有的分子特征包括高度保守的 C 端非胶原 (NC1) 结构域以及约有 1 000 个氨基酸残基的 Triple-helical 结构域，且从无脊椎动物到脊椎动物，纤维胶原最保守的部分是 NC1 结构域^[30-31]。本研究也证实了浅色黄姑鱼与其他脊椎动物 pro- $\alpha 2$ (I) 链的 Triple-helical 域和 NC1 结构域氨基酸序列高度同源。另外，对浅色黄姑鱼 pro- $\alpha 2$ (I) 链进行系统发育分析显示：COL1A2 在所有脊椎动物中存在明显分离，新克隆到的 COL1A2 与硬骨鱼属于同一类群，并与大黄鱼形成 1 个单系类群，关系密切，印证了浅色黄姑鱼 COL1A2 氨基酸序列与大黄鱼最为相似 (96.60%)，也印证了胶原蛋白具有保守的蛋白质功能。

3.2 COL1A2 基因在不同组织中的差异表达与胶原蛋白组织分布特异性

本研究探讨了 COL1A2 基因在浅色黄姑鱼不同组织中的表达谱，发现浅色黄姑鱼 COL1A2 基因在肌肉、鱼鳔、皮肤、鳞片、鳍条、肝脏、小肠和脊柱中均有表达，尤其在鱼鳔、脊柱和皮肤中的表达量显著高于其他 5 种组织。此结果与对斑马鱼^[28]、草鱼^[10]和金鱼^[32]的研究结果一致，表明 COL1A2 在不同组织中广泛表达，尤其是在皮肤、鳃和鳍条中高表达。COL1A2 基因的表达差异可能与不同组织中胶原蛋白的生物合成、羟基化程度以及胶原分子类型和交联有关^[33-34]，如：骨胶原和结缔组织胶原分子存在很大差异，IV 型胶原是骨胶原的主要成分；而在皮肤中，胶原纤

维主要由 I 型胶原 (80%~85%)、III 型胶原 (10%~15%) 和少量 V 型胶原组成^[35]。不同类型的胶原由不同基因编码, 胶原蛋白基因的功能还受到许多细胞因子的调控, 这也可能是引起 COL1A2 基因在不同组织中差异表达的重要原因。

有研究报道胶原蛋白在动物组织中广泛分布, 但其含量却存在有较大差异^[6, 36]。胶原蛋白是实质性器官——基底膜的主要成分, 在骨骼中超过 80% 的有机质是胶原蛋白, 它在骨骼与结缔组织中发挥作用的主要方式是形成和保持骨架的完整性^[37-38]。在鱼鳔和皮肤等结缔组织中胶原蛋白的含量也非常高, 如鱼鳔中胶原蛋白约占其湿质量的 30%, 占鱼鳔蛋白总量的 70% 以上^[39]。胶原蛋白的三聚体有很高的抗拉强度, 胶原的三螺旋结构域对组织的热稳定性具有重要意义, 这可能是由于胶原蛋白定向沉积导致不同组织的功能不同^[40]。本研究结果显示: 各组织中胶原蛋白的含量存在显著差异, 以鱼鳔中的胶原蛋白含量最高, 其次是脊柱、鱼鳞和皮肤, 肝、肠、肌肉和鳍条中胶原蛋白的含量相对较少。结合组织中 COL1A2 的表达特异性, 结缔组织 (鱼鳔、脊柱和皮肤) 中 COL1A2 相对表达量显著高于肝脏和小肠, 表明 COL1A2 在组织中的相关表达量、胶原蛋白含量与组织的生物功能密切相关。

4 结论

本研究首次克隆了浅色黄姑鱼 COL1A2 基因, 其 cDNA 序列全长 5826 bp, 编码 1352 个氨基酸, 与同科的大黄鱼同源性最高。COL1A2 蛋白质肽分子量为 126.74 ku, 具有典型的三重螺旋结构域等特征。不同组织中 COL1A2 基因表达谱与其胶原蛋白组织分布高度一致。推测不同组织中胶原蛋白含量的差异可能是由于 COL1A2 基因的分子特征引起组织特异性表达, 最终导致不同的生物学效应。研究结果可充实鱼类胶原蛋白研究的基础理论, 对今后开展鱼类胶原蛋白代谢及其调控机制的探讨具有重要意义。

[参考文献]

- GORDON M K, HAHN R A. Collagens[J]. Cell and Tissue Research, 2010, 339(1): 247. DOI: 10.1007/s00441-009-0844-4.
- GELSE K, POSCHL E, AIGNER T. Collagens: structure, function, and biosynthesis[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003, 55(12): 1531. DOI: 10.1016/j.addr.2003.08.002.
- RICARD-BLUM S, RUGGIERO F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane[J]. Pathologie Biologie, 2005, 53(7): 430. DOI: 10.1016/j.patbio.2004.12.024.
- SYLVIE R B. The collagen family[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011, 3(1): 1. DOI: 10.1101/cshperspect.a004978.
- EXPOSITO J Y, VALCOURT U, CLUZEL C, et al. The fibrillar collagen family[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(2): 407. DOI: 10.3390/ijms11020407.
- RONG H, LIN F, LIMBU S M, et al. Effects of dietary proline on swim bladder collagen synthesis and its possible regulation by the TGF- β /Smads pathway in spotted drum, *Nibea diacanthus*[J]. Aquaculture Nutrition, 2020, 26(5): 1792. DOI: 10.1111/anu.13130.
- MAHBOOB S. Isolation and characterization of collagen from fish waste material- skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(7): 4296. DOI: 10.1007/s13197-014-1520-6.
- CHEN S J, CHEN H, XIE Q N, et al. Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*)[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 52: 468. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.07.027.
- HUANG C Y, KUO J M, WU S J, et al. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis* sp.) by a novel extrusion-hydro-extraction process[J]. Food Chemistry, 2016, 190: 997. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.06.066.
- YU E M, LIU B H, WANG G J, et al. Molecular cloning of type I collagen cDNA and nutritional regulation of type I collagen mRNA expression in grass carp[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2014, 98(4): 755. DOI: 10.1111/jpn.12132.
- SAITO M, TAKENOUCI Y, KUNISAKI N, et al. Complete primary structure of rainbow trout type I collagen consisting of $\alpha 1$ (I) $\alpha 2$ (I) $\alpha 3$ (I) heterotrimers[J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 268(10): 2817. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2001.02160.x.
- GISTELINCK C, KWON R Y, MALFAIT F, et al. Zebrafish type I collagen mutants faithfully recapitulate human type I collagenopathies[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018, 115(34): 8037. DOI: 10.1073/pnas.1722200115.
- HWANG J H, YOKOYAMA Y, MIZUTA S, et al. cDNA cloning and characterization of type I procollagen $\alpha 1$ chain in the skate *Raja kenoi*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 144(1): 1. DOI: 10.1016/j.cbpb.2005.12.026.
- 刘邦辉, 郁二蒙, 王广军, 等. 草鱼 I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 基因 cDNA 全序列克隆、组织分布及其生物信息学分析[J]. 水产学报, 2012, 36(6): 849. DOI: 10.3724/SP.J.1231.2012.27768.
- 古群红, 罗志平, 吴缥缈, 等. 浅色黄姑鱼的池塘养殖试验[J]. 中国水产, 2011(8): 27. DOI: 10.3969/j.issn.1002-

- 6681.2011.08.013.
- [16] HUANG Y S, LIN Z D, RONG H, et al. Effects of conjugated linoleic acid on growth, body composition, antioxidant status, lipid metabolism and immunity parameters of juvenile Chu's croaker, *Nibea coibor*[J]. Aquaculture Research, 2018, 49(1): 546. DOI: [10.1111/are.13486](#).
 - [17] LIN Z D, HUANG Y S, ZOU W G, et al. Cloning, tissue distribution, functional characterization and nutritional regulation of a fatty acyl Elov15 elongase in Chu's croaker *Nibea coibor*[J]. Gene, 2018, 659: 11. DOI: [10.1016/j.gene.2018.03.046](#).
 - [18] ZOU W G, LIN Z D, HUANG Y S, et al. Effect of dietary vitamin C on growth performance, body composition and biochemical parameters of juvenile Chu's croaker (*Nibea coibor*)[J]. Aquaculture Nutrition, 2020, 26(1): 60. DOI: [10.1111/anu.12967](#).
 - [19] LIN F, RONG H, LIN J L, et al. Enhancement of collagen deposition in swim bladder of Chu's croaker (*Nibea coibor*) by proline: view from *in-vitro* and *in-vivo* study[J]. Aquaculture, 2020, 523: 735175. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2020.735175](#).
 - [20] RONG H, ZHANG Y L, HAO M L, et al. Effect of hydroxyproline supplementation on growth performance, body composition, amino acid profiles, blood-biochemistry and collagen synthesis of juvenile Chu's croaker (*Nibea coibor*)[J]. Aquaculture Research, 2020, 51(3): 1264. DOI: [10.1111/are.14477](#).
 - [21] HIRWITZ W, LATIMER G. Official methods of analysis of AOAC international (16th edn)[J]. Trends in Food Science & Technology, 1995, 6(11): 382. DOI: [10.1016/0924-2244\(95\)90022-5](#).
 - [22] EXPOSITO J Y, GARRONE R. Characterization of a fibrillar collagen gene in sponges reveals the early evolutionary appearance of two collagen gene families[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990, 87(17): 6669. DOI: [10.1073/pnas.87.17.6669](#).
 - [23] EXPOSITO J Y, D'ALESSIO M, SOLURSH M, et al. Sea urchin collagen evolutionarily homologous to vertebrate pro- α 2 (I) collagen[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(22): 15559. DOI: [10.1016/S0021-9258\(19\)49572-0](#).
 - [24] ENGEL J, BACHINGER H P. Structure, stability and folding of the collagen triple helix[J]. Topics in Current Chemistry, 2005, 247: 7. DOI: [10.1007/b103818](#).
 - [25] MOTOOKA D, KAWAHARA K, NAKAMURA S, et al. The triple helical structure and stability of collagen model peptide with 4 (s)-hydroxyprolyl-pro-gly units[J]. Peptide Science, 2012, 98(2): 111. DOI: [10.1002/bip.21730](#).
 - [26] BRODSKY B, PERSIKOV A V. Molecular structure of the collagen triple helix[J]. Advances in Protein Chemistry, 2005, 70: 301. DOI: [10.1016/S0065-3233\(05\)70009-7](#).
 - [27] RUOSLAHTI E, PIERSCHBACHER M D. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal[J]. Cell, 1986, 44(4): 517. DOI: [10.1016/0092-8674\(86\)90259-X](#).
 - [28] DUBOIS G M, HAFTEK Z, CROZET C, et al. Structure and spatio temporal expression of the full-length DNA complementary to RNA coding for α 2 type I collagen of zebrafish[J]. Gene, 2002, 294(1/2): 55. DOI: [10.1016/S0378-1119\(02\)00770-9](#).
 - [29] BARNES A M, ASHOK A, MAKAREEVA E N, et al. *COL1A1* C-propeptide mutations cause ER mislocalization of procollagen and impair C-terminal procollagen processing[J]. Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease, 2019, 1865(9): 2210. DOI: [10.1016/j.bbdis.2019.04.018](#).
 - [30] BOOT-HANDFORD R P, TUCKWELL D S, PLUMB D A, et al. A novel and highly conserved collagen (pro α 1 (XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(33): 31067. DOI: [10.1074/jbc.M212889200](#).
 - [31] GEORGE B G, DAVID A, BENOIT C. Principles of bone biology[M]. London: Academic Press, 2020.
 - [32] KONDO H, WATABE S. Temperature-dependent enhancement of cell proliferation and mRNA expression for type I collagen and HSP70 in primary cultured goldfish cells[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 2004, 138(2): 221. DOI: [10.1016/j.cbpb.2004.04.001](#).
 - [33] VARGA F, RUMPLER M, ZOEHRER R, et al. T3 affects expression of collagen I and collagen cross-linking in bone cell cultures[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 402(2): 180. DOI: [10.1016/j.bbrc.2010.08.022](#).
 - [34] TURECEK C, FRATZL-ZELMAN N, RUMPLER M, et al. Collagen cross-linking influences osteoblastic differentiation[J]. Calcified Tissue International, 2008, 82(5): 392. DOI: [10.1007/s00223-008-9136-3](#).
 - [35] HULMES D J S. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures[J]. Journal of Structural Biology, 2002, 137(1/2): 2. DOI: [10.1006/jsbi.2002.4450](#).
 - [36] RONG H, ZHANG Y L, HAO M L, et al. Effects of dietary hydroxyproline on collagen metabolism, proline 4-hydroxylase activity, and expression of related gene in swim bladder of juvenile *Nibea diacanthus*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2019, 45(6): 1779. DOI: [10.1007/s10695-019-00676-9](#).
 - [37] GARNERO P. The role of collagen organization on the properties of bone[J]. Calcified Tissue International, 2015, 97(3): 229. DOI: [10.1007/s00223-015-9996-2](#).
 - [38] FERREIRA A M, GENTILE P, CHIONO V, et al. Collagen for bone tissue regeneration[J]. Acta Biomaterialia, 2012, 8(9): 3191. DOI: [10.1016/j.actbio.2012.06.014](#).
 - [39] WEN J, ZENG L, CHEN Z M, et al. Comparison of nutritional quality in fish maw product of croaker *Protonibea diacanthus* and perch *Lates niloticus*[J]. Journal of Ocean University of China, 2016, 15(4): 726. DOI: [10.1007/s11802-016-2870-7](#).
 - [40] VON DER MARK K. Principles and clinical applications [M]. Burlington: Academic Press, 2006.

责任编辑: 何承刚