

## 鲫和鳊主要过敏原小清蛋白的基因克隆及序列分析

阮密密<sup>1,2,3</sup>, 蔡秋凤<sup>1,2</sup>, 刘光明<sup>1,2</sup>, 曾伶俐<sup>1,2</sup>, 苏文金<sup>1,2</sup>, 曹敏杰<sup>1,2\*</sup>

(1. 集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021;

2. 集美大学福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021;

3. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

**摘要:** 小清蛋白(parvalbumin, PV)是鱼类的主要过敏原, 为分析淡水鱼 PV 的序列及结构特征, 采用 RT-PCR 方法, 从鲫和鳊肌肉中分别克隆得到 2 种小清蛋白的基因序列。生物信息学分析结果显示, 4 种基因的序列长度均为 330 bp, 编码 109 个氨基酸残基, 推导分子量在 11.6 ku 左右, 等电点为 4.45~4.69。氨基酸序列分析表明, 克隆得到的这 4 种 PV 序列均含有丙氨酸-14、亮氨酸-16、半胱氨酸-19、苯丙氨酸-67、谷氨酰胺-69 以及苏氨酸-79 等  $\beta$  型 PV 特征性残基序列, 表明克隆的目的基因均为  $\beta$  型 PV。鲫的 2 种 PV 序列相似性为 80.73%, 鳊的 2 种 PV 的序列相似性为 83.49%。对克隆得到的 PV 序列进行空间结构分析显示, 这 4 种 PV 序列均含有 3 个螺旋-松弛-螺旋结构, 即 EF-手型结构, 其中靠近 C 端功能域的两个手型结构为  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点。

**关键词:** 鲫; 鳊; 小清蛋白; 基因克隆; 生物信息学分析

**中图分类号:** Q 785; S 917

**文献标志码:** A

食物过敏现在已成为重要的公共健康问题, 2004 年吕相征等<sup>[1]</sup>对中国医科大学 4 052 名学生食物过敏的流行情况进行调查, 结果表明, 在 15~24 岁年龄段健康人群中, 约有 6% 的人曾患有食物过敏, 其中鱼类过敏的比例达到过敏总人数的 18.2%。

许多研究表明, 鱼类中主要的过敏原为小清蛋白(parvalbumin, PV), 它能引起 IgE 介导的过敏反应, 而且不同来源的小清蛋白之间可以产生免疫交叉反应<sup>[2-3]</sup>。小清蛋白是一种水溶性  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白, 分子量约为 12 ku, 对热、化学变性及蛋白水解酶都非常稳定<sup>[4-5]</sup>。根据氨基酸组成不同, 小清蛋白可以分为  $\alpha$  和  $\beta$  两种类型,  $\alpha$  型小清蛋白的等电点一般大于 5.0, 而  $\beta$  型由于含有较多的酸性氨基酸残基, 其等电点一般小于 4.5<sup>[6]</sup>。

小清蛋白在低等脊椎动物的肌肉组织中有较高的含量, 而在高等脊椎动物的肌肉组织中则含量相对较少<sup>[7-8]</sup>。目前对鱼类小清蛋白的研究主要

集中在对海水鱼的研究。研究表明, 鱼类中小清蛋白主要存在于白色肉的快骨骼肌中<sup>[9-10]</sup>, 每种鱼的白色肉中同时含 2~3 种亚型。一些硬骨鱼在其整个生长发育过程中可产生 3~5 种亚型<sup>[11-12]</sup>。Brownridge 等<sup>[13]</sup>从鲤 (*Cyprinus carpio*) 肌肉中同时克隆得到 8 种小清蛋白基因, 但只有 2 种基因的表达量较高。本实验室从鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 中也纯化得到 3 种不同的小清蛋白, 分子量为 10~14 ku<sup>[14-15]</sup>。

中国是淡水鱼生产和消费大国, 因食用淡水鱼而引起过敏的现象时有发生, 因此研究其主要过敏原有十分重要的意义。鲫 (*Carassius auratus*) 是一种杂食性鱼; 鳊 (*Siniperca chuatsi*) 则为典型的肉食性鱼类, 这两种鱼在我国分布广泛, 为重要的淡水经济鱼类。本实验以鲫、鳊为研究对象, 从分子水平研究小清蛋白的结构和性质特征, 为淡水鱼过敏原的研究提供理论依据。

收稿日期: 2011-12-26 修回日期: 2012-09-07

资助项目: 国家自然科学基金项目(31071519); 福建省自然科学基金项目(2010J01044, 2010J06012); 集美大学科研基金(ZQ2011011)

通讯作者: 曹敏杰, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与试剂

鲜活鲫、鳊购于福建厦门集美菜市场。总 RNA 提取试剂购于罗氏公司; TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、100 bp DNA ladder、DNA 纯化回收试剂盒购自天根生物有限公司; pGEM-T 载体购于 Promega 公司。

### 1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

分别取鲫、鳊背部肌肉, 在液氮中迅速研磨, 取约 50 mg 研碎的组织至 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL Trizol, 充分组织匀浆后室温放置 5 min, 加入 200  $\mu$ L 三氯甲烷, 剧烈振荡 15 s, 静置 3 min, 4  $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 15 min, 将上层水相转入新的离心管中, 加入等体积的异丙醇, 充分混匀, 室温放置 30 min, 4  $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清, 用 1 mL 75% 的乙醇洗涤沉淀, 室温干燥 5 min。加入 20  $\mu$ L DEPC 处理水溶解, 并测定 RNA 纯度及浓度。利用 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA, 于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

### 1.3 引物设计与合成

根据已报道的鲤小清蛋白基因序列(GenBank Accession: AJ292212)设计扩增引物, 由 Invitrogen 公司合成(表 1)。

表 1 PCR 扩增小清蛋白 cDNA 所用引物  
Tab. 1 PCR primers used for amplification of PV cDNA

引物 primer	序列 primer sequence	退火温度/ $^{\circ}$ C annealing temperature
Co-F	ATGGCATTTCGCTGGAATTCTG	50.2
Co-R	TGCCATTTATGCCTTGACCAG	50.2

### 1.4 小清蛋白基因序列的克隆

以上述 cDNA 为模板, 用 *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。反应体系 25  $\mu$ L, 其中模板 cDNA 1  $\mu$ L, 10  $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L, 10 nmol/L 上下游引物各 1  $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.3  $\mu$ L, 用 17.2  $\mu$ L 灭菌的 ddH<sub>2</sub>O 补足 25  $\mu$ L。扩增条件为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52  $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。

PCR 目的产物经琼脂糖凝胶电泳后回收纯化, 将纯化后的 DNA 片段与 T 载体连接, 构建重组克隆质粒, 转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 在含 5  $\mu$ L

IPTG(浓度为 200 g/L)、40  $\mu$ L X-gal (浓度为 20 g/L) 及 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上挑选白色菌落, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜后, 提取质粒, 经 PCR 鉴定后, 阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

### 1.5 小清蛋白基因及其编码产物的序列分析

通过 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 工具进行核酸相似性检索。应用 DNAMAN 软件推导氨基酸序列, 并进行序列相似性分析。蛋白质的分子质量、等电点及基本性质分析用 Prot Param(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 进行预测。应用软件 MEGA 5.0 构建基于小清蛋白氨基酸序列的系统进化树。通过 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 构建小清蛋白的三级结构模型, 利用 PyMol 软件对模型进行相关分析及显示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PV 基因的扩增

提取鲫和鳊的肌肉总 RNA, 电泳检测均显示 28S、18S 条带清晰, 且 28S 的亮度约为 18S 的 2 倍, 说明提取的 RNA 完整性良好, 符合后续 PCR 扩增的要求。利用 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA。

分别以合成的鲫和鳊 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 电泳结果如图 1 所示, 在 330 bp 左右分别有 1 条亮带, 与预测的目的片段长度相符。分别回收扩增产物并测序。结果表明, 从鲫和鳊肌肉中

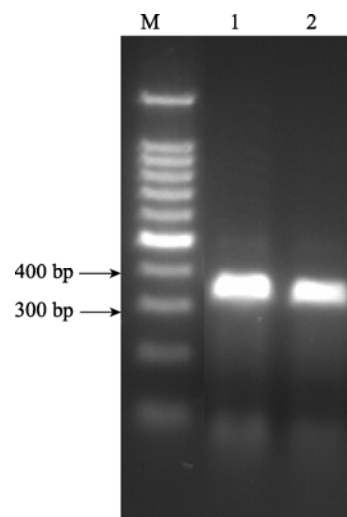


图 1 PV 基因扩增产物的电泳图

M. 100 bp 分子量标准; 1. 鲫 PV; 2. 鳊 PV。

### Fig. 1 Agarose gel analysis of PV products

M. 100 bp DNA ladder; 1. PCR product of PV from crucian carp; 2. PCR product of PV from mandarin fish.

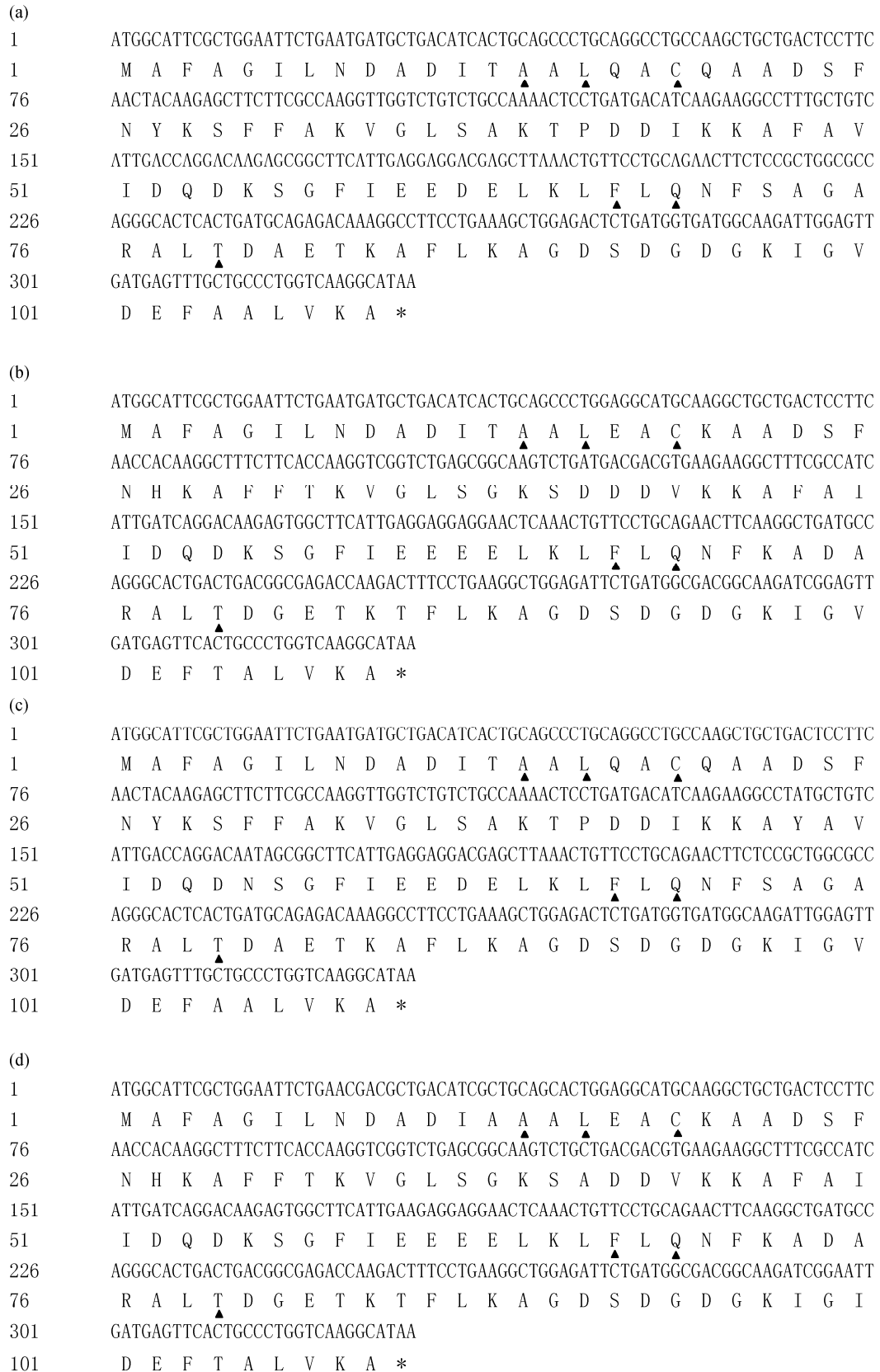


图 2 PV 完整编码区的碱基及氨基酸序列

(a) Car-PV1;(b) Car-PV2; (c)Sin-PV1; (d) Sin-PV2;半胱氨酸及β型PV的特征氨基酸残基以三角形(▲)标出。

Fig. 2 The encoding and deduced amino acids sequence of PVs

(a) Car-PV1; (b) Car-PV2; (c) Sin-PV1; (d) Sin-PV2;Cys and the characteristic amino acid residues were indicated with triangle (▲).

分别扩增得到 2 条长度均为 330 bp 的序列。对结果进行 BLAST 比对发现, 得到的序列和已报道的鲤 PV 序列相似性均在 90% 左右, 证明获得的 4 条序列均为 PV 基因, 分别命名为 Car-PV1、Car-PV2 和 Sin-PV1、Sin-PV2, GenBank 登录号分别为 JN190495、JN190494、JN190497、JN190496。

## 2.2 PV 序列分析

实验得到的 4 种 PV 完整编码区全长均为 330 bp, 编码 109 个氨基酸残基, 碱基及推测的氨基酸序列如图 2 所示, 推导的分子量分别为 11.52 ku(Car-PV1)、11.60 ku(Car-PV2) 和 11.52 ku(Sin-PV1)、11.60 ku(Sin-PV2), 等电点分别为 4.48、4.60 和 4.38、4.69。4 种 PV 的氨基酸组成中, 含量最丰富的是丙氨酸, 而组氨酸、脯氨酸和酪氨酸含量较少, 均不含色氨酸。由于 PV 序列中几乎不含酪氨酸和色氨酸, 因此不能依据在 280 nm 波长下的吸收值来判断小清蛋白的含量。4 种 PV 均不含信号肽, 不稳定参数约为 25, 属于稳定蛋白。另外, Car-PV1 和 Sin-PV1 的天冬酰胺-70 均为可能的 N 糖基化位点。4 种 PV 均含有丙氨酸-14、亮氨酸-16、半胱氨酸-19、苯丙氨酸-67、谷氨酰胺-69 以及苏氨酸-79 等  $\beta$  型小清蛋白特征性氨基酸残基, 表明本实验克隆得到的 PV 均为  $\beta$  型 PV。

Car-PV1 和 Car-PV2 的氨基酸序列相似性为 84.40%, Sin-PV1、Sin-PV2 氨基酸序列相似性为 83.49%。本实验首次从鲫肌肉中克隆得到 2 种 PV 的基因序列。虽然在 GenBank 中已登录了鳊的 4 种 PV, 但这些序列与本实验得到的 Sin-PV1、Sin-PV2 序列比对结果显示, 其相似性为 74%~87%, 表明本实验获得的鳊的 2 种 PV 为新亚型。

## 2.3 PV 氨基酸序列相似性及系统进化关系分析

将 4 种 PV 的氨基酸序列与其它海水鱼和淡水鱼的 PV 序列进行比对(图 3), Car-PV1、Sin-PV1 与淡水鱼[鲤、斑马鱼(*Danio rerio*)、鲢]PV 序列相似性均大于 93%, 与淡水鳊鱼 PV 的序列相似性为 86%。Car-PV2、Sin-PV2 与其它淡水鱼 PV[鲤、斑马鱼、鳊、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、蓝鲶、淡水鳊]序列相似性均大于 80%; 与海水鱼比对结果发现, 北极鳕 PV 与 Car-PV1、Sin-PV1 序列相似性较高, 分别为 93% 和 91%, 但其它海水鱼 PV(包括白腹鲷(*Scomber japonicus*)、黄鳍金

枪鱼(*Thunnus albacares*)、大西洋鳕、牙鲆等)与 Car-PV1、Car-PV2、Sin-PV1、Sin-PV2 的序列相似性为 75%~85%。另外, 实验得到的 4 种 PV 与其他脊椎动物(包括人、牛、野猪、狗、欧洲兔、家鼠、鸡等)的序列相似性仅为 50%~60%。

实验得到的鲫和鳊 PV 的氨基酸序列与淡水鱼 PV 的序列同源性略高于海水鱼。这些 PV 序列的  $\text{Ca}^{2+}$  结合区域的序列均很保守, 其差异主要存在于靠近 N 端的序列。另外, 在比对的 PV 序列中, 均含有一个保守的半胱氨酸残基, 这个半胱氨酸的巯基有利于产生链间二硫键, 形成二聚体, 从而提高 PV 的稳定性<sup>[15-16]</sup>。

使用软件 MEGA 5.0, 用最大似然法(ML 法)对不同物种基于 PV 序列构建系统进化树发现, 鱼类与其他脊椎动物形成两个分支, 鱼类中同一类型的 PV 聚为一簇, 并分成两个同源组, 说明 PV 出现不同的基因型晚于鱼类的分化产生, 但早于硬骨鱼产生(图 4)。用于序列比对及系统进化树分析的 PV 的物种来源及登录号列于表 2。

表 2 用于构建系统进化树的 PV 物种来源及登录号  
Tab. 2 Sources and GenBank accession numbers of PVs for phylogenetic tree construction

物种 species	GenBank 登录号 accession number
<i>Cyprinus carpio</i> PV 1	CAC83658
<i>Cyprinus carpio</i> PV 2	CAC83659
<i>Danio rerio</i> PV 1b	NP_956506
<i>Danio rerio</i> PV 1c	AAO33402
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> PV	ACI95744
<i>Hypophthalmichthys nobilis</i> PV	ACI01049
<i>Boreogadus saida</i> PV	ACN49203
<i>Anguilla japonica</i> PV	BAF98922
<i>Scomber japonicus</i> PV	BAC66618
<i>Thunnus albacares</i> PV	CAQ72967
<i>Gadus morhua</i> PV	CAM56786
<i>Paralichthys olivaceus</i> PV	BAF98925
<i>Homo sapiens</i> PV	CAA36924
<i>Bos taurus</i> PV	CAQ72973
<i>Sus scrofa</i> PV	NP_001177086
<i>Canis lupus familiaris</i> PV alpha isoform 3	XP_538399
<i>Oryctolagus cuniculus</i> PV	XP_002711455
<i>Mus musculus</i> PV	CAA38434
Chickens PV	AAB19756

## 2.4 PV 的三级结构预测

小清蛋白二级结构中包含  $\alpha$  螺旋、随机卷曲 2 种结构元件, 不含  $\beta$  折叠。利用 SWISS-MODEL 服务器, 分别以鲤 PV<sup>[17]</sup> (Car-PV1、Sin-PV1)、银无须鳕 B 型 PV<sup>[18]</sup> (Car-PV2、Sin-PV2) 作为模板序列, 预测 4 种 PV 的三级结构(图 5), 该蛋白含有

Car-PV1	MAFAGILNDADITAALQACQAADSFNYKSFPAKVLGSAKTPDDIKKAFVITDQDK	55
Car-PV2	-----e-k-----h-a-t-----g-sd-v-----i-----	55
Sin-PV1	-----y-----n-----	55
Sin-PV2	-----a-e-k-----h-a-t-----g-sa-v-----i-----	55
<i>C. carpio</i> PV 1	-----g-----d-----	55
<i>D. rerio</i> PV 1b	-----e-----d-----	55
<i>H. molitrix</i> PV	-----e-v-----k-d-----s-----	55
<i>D. rerio</i> PV 1c	----v----s-e-k----h-----as-sa-ev----i-----	55
<i>H. nobilis</i> PV	----l----a-e-kd----h-a-----ss-v----i-----	55
<i>I. punctatus</i> PV	----v-----d-k-dg--h--t--tg-sa-v----i-----	55
<i>I. furcatus</i> PV	----v-----d-k-dg-dh--t--tg-sa-v----i-----	55
<i>A. japonica</i> PV	----v-k-----e-k-----a-----n-s-----si-----	55
<i>B. saida</i> PV	-----k-e-----c-d-----sa-----fl-----	55
<i>S. japonicus</i> PV	----sv-k--ev--dg-k-g-dh-k-kac--g-st-ev----i-----	55
<i>T. albacares</i> PV	-----te-----a-----k-d-t--a--e-----	55
<i>G. morhua</i> PV	-----a-k-eg-dh-a-t--a-ssa--v-ei-----	55
<i>P. olivaceu</i> PV	-sl-sk-se-----ae--g--h-k-----s-a-a-----	55
Car PV1	SGFIEEDELKLFQNFSAARALDAETKAFKAGDSGDGKIGVDEFAALVKA	109
Car PV2	-----e-----k-d-----g--t-----t-----	109
Sin PV1	-----	109
Sin PV2	-----e-----k-d-----g--t-----i--t-----	109
<i>C. carpio</i> PV 1	-----	109
<i>D. rerio</i> PV 1b	-----s-----	109
<i>H. molitrix</i> PV	-----d-----v-----	109
<i>D. rerio</i> PV 1c	-----e-----k-d-----g--t-----y--iy--f-----	109
<i>H. nobilis</i> PV	-----k-----i-----m-----	109
<i>I. punctatus</i> PV	-----kss-----t--t-----s-----	109
<i>I. furcatus</i> PV	-----kss-----d--t--t-----s-----	109
<i>A. japonica</i> PV	-----k--k--q--t--i--v-----	109
<i>B. saida</i> PV	-----g-----	109
<i>S. japonicus</i> PV	-----e-----k--s-----i--mi-g-----	109
<i>T. albacares</i> PV	-----m-----i-----	109
<i>G. morhua</i> PV	-d-v-----s--v-----g-mi--	109
<i>P. olivaceu</i> PV	-d-----s-----e-----m-q-----	109

图3 Car-PV1、Car-PV2、Sin-PV1、Sin-PV2与其他鱼类PV氨基酸序列比较  
Ca<sup>2+</sup>结合区域用黑框标明。

Fig. 3 Alignment of parvalbumin amino acids among Car-PV1, Car-PV2, Sin-PV1, Sin-PV2 and other fish species  
The Ca<sup>2+</sup> binding sequences are highlighted with black boxes.

6个α螺旋(A-F), 形成3个螺旋-转角-螺旋结构, 每个区域都是由2个大小一致的α螺旋及其间隔的一个转角结构组成, 并折叠成紧密的球状。这是典型的EF-手型结构, 在Ca<sup>2+</sup>结合蛋白家族中是特征的Ca<sup>2+</sup>结合区域, 其中CD、EF结构域靠近C端,

形成双对称结构, 这2个结构域形成1个疏水表面, 靠近N端的AB结构域形成1个帽子结构, 覆盖住这一疏水表面。Ca<sup>2+</sup>结合位点位于CD、EF结构域的卷曲部分, 即52~64和91~103两段氨基酸序列之间。

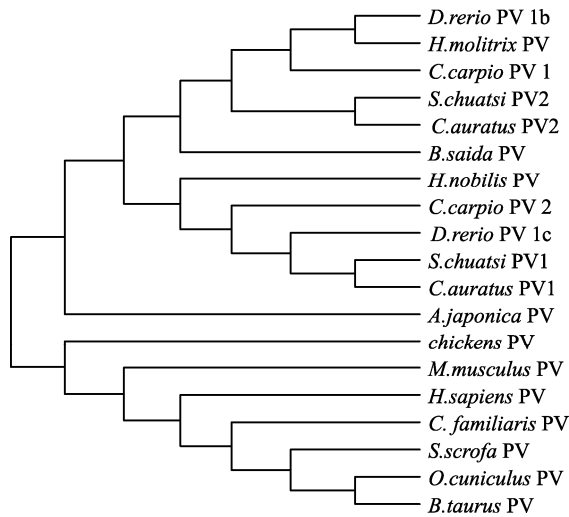


图 4 PVs 的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of PVs from different organisms

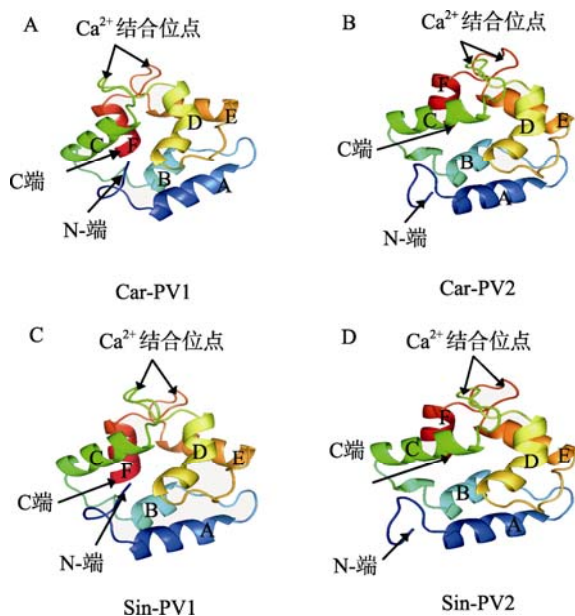


图 5 利用 SWISS-MODEL 服务器构建 Car-PV1、Car-PV2、Sin-PV1 和 Sin-PV2 三级结构模型  
Fig. 5 The predicted three-dimensional structures of Car-PV1, Car-PV2, Sin-PV1 and Sin-PV2 using SWISS-MODEL

PV 的三级结构相似, 由 3 个结构域组成, 每个结构域约含有 30 个氨基酸残基<sup>[19]</sup>。PV 靠近 N 端的 AB 结构域无二价阳离子结合能力, 但它对整个 PV 的  $\text{Ca}^{2+}$  结合能力有调节作用<sup>[20-21]</sup>, 正是这种差异导致了不同来源的 PV 具有相似的  $\text{Ca}^{2+}$  结合能力<sup>[22]</sup>。

早在 1983 年就有学者研究发现, 鳊 PV 的免疫原反应位点位于 3 个部位: AB、CD 结构域之间的卷曲结构, CD、EF 结构域之间的卷曲结构, 以及

EF 结构域中的卷曲结构。其中, EF 之间的卷曲结构具有  $\text{Ca}^{2+}$  结合活性<sup>[4]</sup>。随后的研究发现, 在免疫印迹反应过程中加入金属离子螯合剂 EGTA, 鳊、太平洋鲈 PV 与 IgE 的反应程度下降 50% 以上<sup>[5,23]</sup>。Tomura 等<sup>[23]</sup>将太平洋鲈 PV 的 D-51、A-90 进行点突变后, 该蛋白几乎完全丧失了免疫原性, 这些研究结果都说明 PV 具有对  $\text{Ca}^{2+}$  敏感的 IgE 结合位点。

由于 PV 的高同源性, 且  $\text{Ca}^{2+}$  结合区域氨基酸序列极其保守, 各种不同来源的 PV 之间容易产生免疫交叉反应<sup>[3]</sup>, 这也说明  $\text{Ca}^{2+}$  结合区域很有可能是其抗原决定簇。本研究克隆得到的两种淡水鱼的 4 种 PV 的氨基酸序列相似性较高。序列比对进一步分析显示, 克隆得到的 4 种 PV 与其它淡水鱼 PV 之间的同源性略高于海水鱼 PV。但在淡水鱼和海水鱼中,  $\text{Ca}^{2+}$  结合区域氨基酸序列均高度保守, 差异主要存在于靠近 N 端的 AB 结构域的氨基酸序列, 该序列上的差异对于 PV 免疫活性是否存在影响还有待深入研究。

### 3 结论

本研究首次从鲫肌肉中克隆得到 2 种 PV 的基因序列, 同时还从鳊肌肉中克隆得到 2 种 PV 基因的新亚型。对获得的序列进行特征分析、同源性比对、进化关系分析以及三级结构构建等研究, 系统分析了淡水鱼 PV 的分子结构特征, 并从理论上对几种鱼类 PV 的结构及过敏原性的差异进行分析。

### 参考文献:

- [1] 吕相征, 刘秀梅, 杨晓光. 健康人群食物过敏状况的初步调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 119-121.
- [2] 刘光明, 史千玉, 蔡秋风, 等. 日本鳊鳊胶原蛋白和小清蛋白的过敏原性[J]. 水产学报, 2010, 34(12): 1882-1889.
- [3] Pascual C, Martin E M, Crespo J F. Fish allergy: Evaluation of the importance of cross-reactivity [J]. The Journal of Pediatrics, 1992, 121(5 Pt 2): S29-S34.
- [4] Elsayed S, Apold J. Immunochemical analysis of cod fish allergen M: Locations of the immunoglobulin binding sites as demonstrated by the native and synthetic peptides [J]. Allergy, 1983, 38(7): 449-459.
- [5] Bugajska-Schretter A, Elfman L, Fuchs T, et al. Parvalbumin, a cross-reactive fish allergen, contains IgE-binding epitopes sensitive to periodate treatment and  $\text{Ca}^{2+}$  depletion [J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1998, 101(1): 67-74.

- [6] Goodman M, Pechere J F, Halech J, *et al.* Evolutionary diversification of structure and function in the family of intracellular calcium-binding proteins [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1979, 13(4): 331–352.
- [7] Lehky P, Blum H E, Stein E A, *et al.* Isolation and characterization of parvalbumins from the skeletal muscle of higher vertebrates [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249(13): 4332–4334.
- [8] Goodman M, Pechere J F. The evolution of muscular parvalbumins investigated by the maximum parsimony method [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1977, 9(2): 131–158.
- [9] Berchtold M W, Brinkmeier H, Muntener M. Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function, plasticity, and disease [J]. *Physiological Reviews*, 2000, 80(3): 1215–1265.
- [10] Chauvigne F, Cauty C, Ralliere C, *et al.* Muscle fiber differentiation in fish embryos as shown by in situ hybridization of a large repertoire of muscle-specific transcripts [J]. *Developmental Dynamics*, 2005, 233(2): 659–666.
- [11] Huriaux F, Vandewalle P, Focant B. Immunological study of muscle parvalbumin isotypes in three African catfish during development [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2002, 132(3): 579–584.
- [12] Focant B, Vandewalle P, Huriaux F. Expression of myofibrillar proteins and parvalbumin isoforms during the development of a flatfish, the common sole *Solea solea*: comparison with the turbot *Scophthalmus maximus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2003, 135(3): 493–502.
- [13] Brownridge P, De Mello L V, Pello M, *et al.* Regional variation in parvalbumin isoform expression correlates with muscle performance in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(2): 184–193.
- [14] 汪宁, 蔡秋风, 刘光明, 等. 鲢骨骼肌过敏原小清蛋白的分离纯化及多克隆抗体制备与应用[J]. *水产学报*, 2010, 34(1): 41–46.
- [15] Liu G M, Wang N, Cai Q F, *et al.* Purification and characterization of parvalbumins from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(6): 1034–1040.
- [16] Ross C, Tilghman R W, Hartmann J X, *et al.* Distribution of parvalbumin isotypes in adult snook and their potential applications as species-specific biomarkers [J]. *Journal of Fish Biology*, 1997, 51(3): 561–572.
- [17] Kumar V D, Lee L, Edwards B F. Refined crystal structure of calcium-liganded carp parvalbumin 4.25 at 1.5-Å resolution [J]. *Biochemistry*, 1990, 29(6): 1404–1412.
- [18] Richardson R C, King N M, Harrington D J, *et al.* X-Ray crystal structure and molecular dynamics simulations of silver hake parvalbumin (Isoform B) [J]. *Protein Science*, 2000, 9(1): 73–82.
- [19] Moncrief N D, Kretsinger R H, Goodman M. Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1990, 30(6): 522–562.
- [20] Cox J A, Durussel I, Scott D J, *et al.* Remodeling of the AB site of rat parvalbumin and oncomodulin into a canonical EF-hand [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 264(3): 790–799.
- [21] Thepaut M, Strub M, Cave A, *et al.* Structure of rat parvalbumin with deleted AB domain: Implications for the evolution of EF-hand calcium-binding proteins and possible physiological relevance [J]. *Proteins*, 2001, 45(2): 117–128.
- [22] Erickson J R, Moerland T S. Functional characterization of parvalbumin from the Arctic cod (*Boreogadus saida*): similarity in calcium affinity among parvalbumins from polar teleosts [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2006, 143(2): 228–233.
- [23] Tomura S, Ishizaki S, Nnagashima Y J, *et al.* Reduction in the IgE reactivity of Pacific mackerel parvalbumin by mutations at Ca<sup>2+</sup>-binding sites [J]. *Fisheries Science*, 2008, 74(2): 411–417.

## Molecular cloning and sequences analysis of parvalbumin gene in crucian carp and mandarin fish

RUAN Mi-mi<sup>1,2,3</sup>, CAI Qiu-feng<sup>1,2</sup>, LIU Guang-ming<sup>1,2</sup>, ZENG Ling-li<sup>1,2</sup>, SU Wen-jin<sup>1,2</sup>, CAO Min-jie<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Jimei University, Xiamen 361021, China;

3. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Parvalbumin (PV) is the major allergen of fish species. So far, research concerning fish allergy has been focused mainly on marine fish. China is the largest consumer and producer of freshwater fish in the world, and many people suffered from allergy when consuming freshwater fish. Therefore, figuring out the molecular characters of PV from freshwater fish would be important. In this study, four gene sequences of PV isoforms were amplified and cloned from crucian carp and mandarin fish by RT-PCR, with two genes from each species. All the four genes were 330 bp in length, encoding 109 amino acid residues. The deduced molecular weight of them was approximately 11.6 ku, and isoelectric points were 4.45–4.69. The existence of amino acid residues of Ala-14, Leu-16, Cys-19, Phe-67, Gln-69 and Thr-79 suggested that all the sequences belonged to  $\beta$ -PV. The identity between the two sequences of crucian carp was 80.73 %, and was 83.49 % in mandarin fish. The identity between PVs from different fish species was higher than 75 % and the sequences of  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites were highly conserved. Phylogenetic tree based on some PV amino acid residues revealed that PVs are clustered into two major clades, teleost fish and other vertebrates. PVs of teleost were clustered into orthologous groups, suggesting duplication of the PV genes before the speciation of teleost while after the speciation of fish. The tertiary structures of these four PVs were constructed using SWISS-MODEL. They all contain three helix-loop-helix motifs named EF-hand. Two domains next to the C terminal were  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites. These results may provide a molecular basis for further study on the allergen of fish PVs.

**Key words:** *Carassius auratus*; *Siniperca chuatsi*; parvalbumin; molecular cloning; sequence analysis

**Corresponding author:** CAO Min-jie. E-mail: mjcao@jmu.edu.cn