

三种淡水鱼皮胶原蛋白膜机械性能和 α_1 链一级结构的相关性研究

唐兰兰¹, 陈书霖¹, 郝更新¹, 苏文金^{1,2}, 翁武银^{1,2}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建厦门 361021)

(2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建厦门 361021)

摘要: 本文探究了三种淡水鱼皮胶原蛋白膜的机械性能和胶原 α_1 链一级结构之间的相关性。结果发现, 利用罗非鱼皮胶原制备的蛋白膜的抗拉伸强度可以达到 51.24 MPa, 高于鲢鱼和草鱼皮胶原制备的蛋白膜, 且色泽更接近白色。在三种鱼皮胶原溶液的圆二色光谱(CD 光谱)中正负吸收峰强度比的绝对值(RPN 值)存在明显差异, 但在胶原蛋白膜的 CD 光谱中 RPN 值却较接近。另一方面, 利用 RT-PCR 和 RACE 的方法克隆了鲢鱼胶原 α_1 链(COL1A1)基因, 结果获得 COL1A1cDNA 全长 4923 bp (NCBI 序列号: KJ848743), 编码 1448 个氨基酸; 系统进化树分析结果表明鲢鱼和草鱼 COL1A1 序列属于同一分支, 与罗非鱼的遗传距离较远。根据三种胶原 α_1 链一级结构的分析结果, 发现罗非鱼胶原 α_1 链的 C-前肽和三螺旋结构域中 G-X-Y 序列中含有更多的 Pro, 因此罗非鱼皮胶原可以形成高强度的蛋白膜。

关键词: 淡水鱼; 胶原蛋白膜; 机械性能; 圆二色光谱; 克隆; 三螺旋结构域

文章编号: 1673-9078(2015)6-59-66

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.010

Correlation between Mechanical Properties of Three Freshwater Fish Skin

Collagen Films and the Primary Structure of the α_1 Chain in Collagen

TANG Lan-lan¹, CHEN Shu-lin¹, HAO Geng-xin¹, SU Wen-jin^{1,2}, WENG Wu-yin^{1,2}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

(2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen, 361021, China)

Abstract: The study aimed to investigate the correlation between mechanical properties of three freshwater fish skin collagen films and the primary structure of the collagen α_1 chain (COL1A1). The results showed that the tensile strength of tilapia skin collagen films reached up to 51.24 MPa, which was higher than those of the silver carp and grass carp skin films. Moreover, the color values of tilapia skin collagen films were closer to those of a white standard plate. Significant differences were observed in the ratios of positive to negative peak (RPN) calculated from the circular dichroism (CD) spectra of the three types of fish collagen solutions, while similar RPN values were observed in the resulting collagen films. Furthermore, the silver carp COL1A1 gene sequence was cloned using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The 4923-bp full-length cDNA of silver carp COL1A1 (GenBank No. KJ848743) was obtained, which encoded 1448 amino acids. The constructed phylogenetic tree showed that the COL1A1 sequences of silver carp and grass carp clustered together, but were distant from that of tilapia. The analysis of the primary structure of COL1A1 indicated that there were more proline residues in the C-peptide and G-X-Y sequences of the triple-helical domain of tilapia COL1A1; therefore, strong collagen films could be formed using tilapia skins.

Key words: freshwater fish; collagen films; mechanical properties; circular dichroism spectra; cloning; triple-helical domain

收稿日期: 2014-09-09

基金项目: 国家自然科学基金(31271984); 福建省杰出青年科学基金项目(2014J06013)

作者简介: 唐兰兰(1989-), 女, 硕士, 研究方向: 蛋白质化学和水产品加工研究

通信作者: 翁武银(1974-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 蛋白质化学和水产加工副产物综合利用研究

胶原具有良好的成膜性能, 形成的胶原蛋白膜具有较弱的抗原性和良好的生物相容性。因此, 胶原蛋白膜不仅可以作为肉类和香肠的包装材料^[1], 而且还可以作为药物载体、伤口敷料、组织工程修复材料等^[2-3]。传统的胶原蛋白膜大多利用牛、猪等陆生动物皮骨提取的胶原制备而成的。然而, 由于疯牛病、口蹄疫等疾病的爆发, 传统的胶原材料不断受到质疑, 因

此鱼类胶原的研究近年来逐渐受到重视。研究表明,淡水鱼类胶原的热稳定性与哺乳动物胶原接近,具有替代哺乳动物胶原的可能^[4-5]。

我国拥有丰富的淡水鱼类资源,2013年淡水鱼类年产量已经超过2600万t^[6]。在淡水鱼加工过程中必然会产生大量的鱼皮、鱼鳞等下脚料,充分利用下脚料中丰富的胶原资源开发新产品,不仅可以促进淡水渔业的经济效益,还可以减少下脚料废弃带来的环境污染。然而,有关淡水鱼类胶原的研究目前主要集中在提取工艺优化方面^[5,7-8],关于胶原蛋白成膜性能的研究却报道较少。

鱼皮I型胶原通常是由 α_1 亚基和 α_2 亚基组成。Duan等^[9]在研究不同季节罗非鱼皮胶原性质时,发现利用夏季捕获的鱼皮提取的胶原其 α_1 亚基含量明显高于冬季。在前期研究中我们也发现 α_1 亚基对胶原蛋白成膜性能起到重要的作用。当利用基因文库中的草鱼与罗非鱼的I型胶原蛋白 α_1 链基因(*COL1A1*)氨基酸序列(NCBI序列号:HM363526.1和AB603656.1)进行比对时,发现两者的同源性只有87%,表明不同来源的淡水鱼胶原蛋白的一级结构明显不同。但是,有关胶原的氨基酸序列对其成膜性能的影响却尚未见报道。

因此,本研究首先利用鲢鱼、草鱼和罗非鱼的鱼皮提取的胶原制备蛋白膜,比较分析它们的理化性质。然后,通过RT-PCR和RACE的方法克隆出鲢鱼胶原 α_1 链的基因,以该基因推导的氨基酸序列与草鱼和罗非鱼的*COL1A1*氨基酸序列进行比较,分析胶原 α_1 链一级结构对胶原蛋白膜机械性能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原料:鲜活的尼罗罗非鱼(约0.5kg),白鲢鱼(约1kg)和草鱼(约1kg)购于当地农贸市场。

菌种:大肠杆菌DH5 α 为农业部东海海水健康养殖重点实验室提供。

主要试剂:氢氧化钠、正丁醇、无水乙醇、乙酸、氯化钠、甘油,AR,西陇化工股份有限公司;Trizol总RNA提取试剂盒,Nitrogen公司;HiScript[®]逆转录酶,Promega公司;Taq DNA聚合酶,Vazyme公司;pMDTM19-T连接试剂盒,宝生物(大连)公司;DNA marker DL 2501、DNA marker DL 2502、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒,上海捷瑞生物公司。

引物:根据NCBI的GenBank中的草鱼(HM363526.1)、鲫鱼(AB275454.1)、虹鳟鱼

(AB052835.1)、日本牙鲈(AB196513.1)、罗非鱼(AB603656.1)和斑马鱼(BC161663.1)的I型胶原 α_1 链(*COL1A1*)基因cDNA全序列进行同源性比对,在保守区间设计了引物(表1),由上海捷瑞生物公司合成。

1.2 主要仪器设备

Avanti J-25 冷冻离心机,美国Bekman公司;UM-113型搅拌脱泡机,日本Unix有限公司;PSX智能型恒温恒湿箱,宁波莱福科技有限公司;UV-8000A紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;厚度仪,日本Ozaki MFG公司;TMS-PRO质构仪,美国Food Technology公司;WSC-S测色色差计,上海精密科学仪器有限公司;J-810圆二色光谱仪,日本JASCO公司;ND-1000微量分光光度计,美国NanoDrop公司;PCR扩增仪,美国Biometra公司。

1.3 试验方法

1.3.1 酸溶性胶原的提取及胶原蛋白膜的制备

1.3.1.1 鱼皮酸溶性胶原的提取

参考文献^[10]的方法在4℃下提取。刚从鱼体剥下的新鲜鱼皮利用冰水漂洗后,加入0.1 mol/L NaOH溶液(物料比1:10, *m/V*),浸泡36 h,用蒸馏水漂洗至中性;加入10% (*V/V*)的正丁醇溶液浸泡12 h(料液比1:10, *m/V*),用蒸馏水冲洗除尽正丁醇;利用10倍体积25%酒精浸泡24 h,用蒸馏水冲洗除尽酒精;利用30倍体积0.5 mol/L的乙酸溶液提取48 h;10000 r/min离心30 min,在上清液中加入NaCl至终浓度2.6 mol/L,静置2 h后离心(10000 r/min, 30 min)。收集沉淀利用0.5 mol/L乙酸溶解,然后利用0.1 mol/L醋酸溶液透析12 h,最后用蒸馏水透析至中性,所得胶原溶液冷冻干燥后保存在-18℃下,供以下实验使用。

1.3.1.2 胶原蛋白膜的制备

参考Nunes等^[11]报道的方法并做适当修改。将胶原溶于0.5 mol/L乙酸中,调整胶原浓度为1% (*m/V*),加入胶原质量20%的甘油,低温真空脱泡后,倒在5 cm \times 5 cm的有机硅树脂框内,置于恒温恒湿箱中(温度(20 \pm 1)℃、相对湿度(RH)(50 \pm 5)%)中干燥48 h后,将膜从有机硅树脂上剥离后再放在恒温恒湿箱中平衡24 h,作为实验的测试样品。

1.3.2 酸溶性胶原和胶原蛋白膜性质分析

1.3.2.1 胶原蛋白膜机械性能的测定

胶原膜机械性能的测定参考翁武银等^[12]报道的方法。将胶原膜切成宽15 mm,长45 mm矩形长条,测定厚度后,利用TMS-PRO质构仪和配套的小型楔型固定夹具对膜进行拉伸试验。力量感应元为100N,

初始间隔为 30 mm, 拉伸速率为 60 mm/min。每种胶原蛋白膜样品重复测试 10 次。膜的拉伸强度 (Tensile strength, TS) 和断裂伸长率 (Elongation at break, EAB) 按照以下公式进行计算:

$$TS(MPa) = F / S$$

$$EAB / \% = (E / 30) \times 100$$

注: F 为膜断裂时承受的最大张力(N), S 为膜的横断面积(m²), 是膜的宽度和厚度的乘积; 30 为膜断裂时被拉伸的长度(mm)。

1.3.2.2 胶原蛋白膜颜色的测定

利用色差计对胶原蛋白膜的颜色进行测定, 膜的颜色以参数 L*(黑-白)、a*(绿-红)、b*(蓝-黄)的值表示。每种胶原蛋白膜样品重复测试 5 次。

1.3.2.3 圆二色光谱分析

室温下利用圆二色光谱仪对胶原溶液和胶原蛋白膜在 190~260 nm 范围内进行扫描。测定胶原溶液时, 将胶原溶于 0.1 mol/L 乙酸溶液, 利用 1 mm 光径的石英比色皿对浓度为 0.1 mg/mL 胶原溶液进行扫描。测定胶原蛋白膜时, 取一定量浓度为 1 mg/mL 的胶原溶液涂在石英片, 干燥成膜后进行扫描。

1.3.3 鲑鱼鱼皮胶原 α₁ 链基因 (COL1A1) cDNA 全序列克隆

1.3.3.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

鲑鱼皮中总 RNA 的提取参照 Trizol 总 RNA 提取试剂盒说明书进行。使用微量分光光度计测定 A260/A280 的值以及 RNA 的浓度, 并利用 2% (m/V) 琼脂糖凝胶电泳检测提取 RNA 的完整性。cDNA 第一链的合成按照 HiScript® 逆转录酶说明书进行。转录过程中使用的引物 5'CDs Primer, 3'CDs Primer 和 SMART II Aligo 见表 1。

1.3.3.2 COL1A1 基因核心序列的克隆

以 cDNA 第一链为模板, 利用表 1 中的引物 (COL1A1 F1-COL1A1 R1, COL1A1 F2-COL1A1 R2, COL1A1 F3-COL1A1 R3, COL1A1 F4-COL1A1 R4) 进行分段 PCR 扩增。反应体系为: 10×buffer 2.5 μL, 2.5 mm/L dNTPs 0.5 μL, 正向引物和反向引物各 1 μL,

cDNA 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 无 RNA 酶 H₂O 18.5 μL。PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 10 min, 16 °C 保温 2 min。经过 1% (m/V) 琼脂糖凝胶电泳确定 PCR 产物后, 再根据说明书利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对 PCR 产物进行回收。

1.3.3.3 COL1A1 基因 3'末端和 5'末端序列的克隆

以 cDNA 第一链为模板, 利用表 1 中引物 (3'RACE inner 和 outer primer, 5'RACE inner 和 outer primer, UPM 和 NUP) 进行巢式 PCR 扩增。PCR 产物经过 1% (m/V) 琼脂糖凝胶电泳确认后, 再利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收。

1.3.3.4 PCR 产物的 TA 克隆和序列测定

将回收的 PCR 产物进行连接反应, 具体步骤根据 pMD19-T 载体试剂盒说明书进行, 利用热激法将连接后的载体转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。转化后的大肠杆菌经氨苄青霉素平板筛选, 挑取菌斑进行菌体 PCR 扩增鉴定, 选取 PCR 呈阳性的单菌落进行测序。测序工作委托上海生工生物工程股份有限公司完成。

1.3.4 COL1A1 基因的生物信息学分析

利用 NCBI 中的 VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>) 对测序结果进行去载体序列处理, 利用 Vector NIT Suite 8.0 软件对得到的 cDNA 序列进行拼接。采用 DNASTar 搜索开放阅读框(ORF)并推导其编码氨基酸序列。同源性比对利用的是 DNAMAN 软件进行。根据氨基酸序列, 利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽。在 NCBI 中检索其他物种 COL1A1 基因 cDNA 全序列, 利用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树。

1.4 数据统计与分析

文中数据均采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 方差分析利用 ANOVA 分析法, 显著性检验方法为 Duncan 多重检验, 检测限为 p<0.05。数据用平均值±标准偏差表示。

表 1 文中使用的引物

Table 1 Primers used in the study

引物名称	引物序列 (5'-3')
3'CDs primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN
5'CDs primer	(T)25VN
SMART II	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
COL1A1 F1	CGCCTCAAAGAGTCTACATGTCTAA
COL1A1 R1	GCTGAATCCTCTGTGCCCTTGA

转下页

接上页

COLIA1 F2	ATCAAGGGACACAGAGGATTCAG
COLIA1 R2	TTGCGGCCAGGCTCACCAGT
COLIA1 F3	GAGGCATGAAGGGACACAGAGG
COLIA1 R3	TTTTTACAAGAARCAGACTGGGCCA
COLIA1 F4	GGCCCTGGAGTTGTTGGACCTAA
COLIA1 R4	TCCTCTGTGTCCCTTCATGCCTC
3'-RACE outer primer	ACATTCAGCTCACCTTCCTGCGCC
3'-RACE inner primer	GAGGGCAACAGCCGCTTCACAT
5'-RACE outer primer	TCGCAGATCACCTCATCGCACAT
5'-RACE inner primer	CAAAAGCACCGTTGCGCTGAGTA
Long: CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT	
UPM (Universal primer mix)	Short: CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP (Nested primer mix)	
	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT

2 结果与讨论

2.1 胶原蛋白膜的理化性质

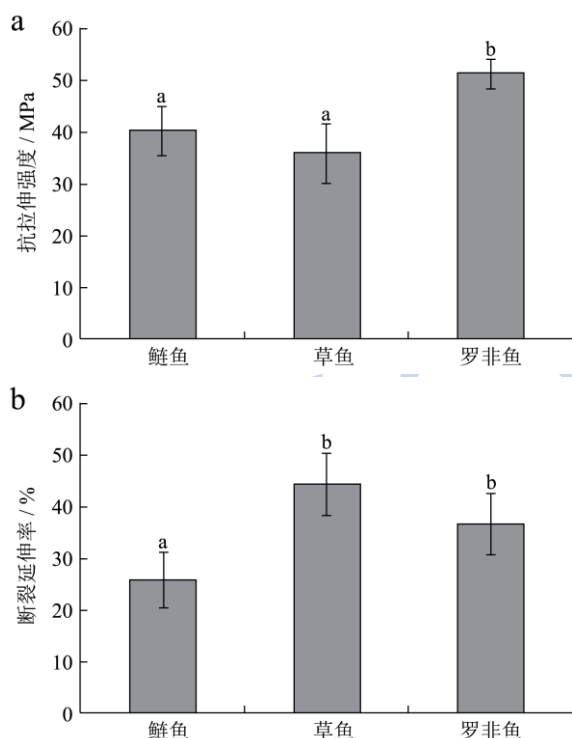


图1 鲢鱼、草鱼和罗非鱼鱼皮胶原蛋白膜的抗拉伸强度(a)和断裂延伸率(b)

Fig.1 Tensile strength (a) and elongation at break (b) of collagen films prepared from the skins of silver carp, grass carp, and tilapia

注: 同一图中相同小写字母表示差异不显著(P>0.05)。

以鲢鱼、草鱼和罗非鱼的鱼皮中提取的酸溶性胶原为基材制备了胶原蛋白膜, 其机械性能的测定结果如图1所示。由图1(A)可知, 鲢鱼皮胶原蛋白膜的抗拉伸强度(TS)与草鱼皮胶原蛋白膜的基本接近, 但明

显低于罗非鱼皮胶原蛋白膜(51.24 MPa)。在前期研究中发现三种淡水鱼皮胶原的分子量分布和氨基酸组成基本一致, 而利用 0.05 mol/L 乙酸溶解的相同质量浓度的罗非鱼胶原溶液在 25 °C 时的粘度和成纤维能力明显高于鲢鱼皮和草鱼皮胶原, 结果导致干燥形成的蛋白膜的 TS 也较大^[13]。而且, 还发现在相同条件下制备的罗非鱼皮明胶膜^[14]和鲢鱼皮明胶膜^[15]的 TS 都显著低于本研究制备的罗非鱼皮胶原蛋白膜和鲢鱼皮胶原蛋白膜。胶原在体外可以通过自组装形成有序的胶原纤维结构, 利用胶原制备的蛋白膜将具有良好的机械性能^[16]; 而明胶是胶原的热变性产物, 在加热提取过程中胶原的三螺旋结构被破坏转变成无规卷曲, 导致提取的明胶失去自组装能力, 因此明胶溶液在干燥成膜过程中, 蛋白分子主要是通过相互缠绕形成网络结构, 结果导致膜的稳定性和机械强度不如胶原形成的蛋白膜。另一方面, 鲢鱼皮胶原蛋白膜的断裂延伸率(EAB)显著小于草鱼皮和罗非鱼皮制备的胶原蛋白膜(图1B)。与本文结果类似, Ninan 等^[17]也发现在相同条件下制备的鲤鱼皮和草鱼皮明胶膜的 EAB 大小不同, 推测与明胶的氨基酸组成和蛋白肽链长度有关。因此, 本研究中三种胶原蛋白膜在 EAB 上的差异也可能是因为氨基酸组成或一级结构的不同。

表2 鲢鱼、草鱼和罗非鱼鱼皮胶原蛋白膜的颜色

Table 2 Color of collagen films prepared from skins of silver carp, grass carp, and tilapia

胶原蛋白膜	颜色		
	L*	a*	b*
鲢鱼	89.72±0.08 ^a	-1.07±0.04 ^a	2.28±0.10 ^b
草鱼	89.82±0.09 ^a	-1.27±0.09 ^b	2.56±0.07 ^c
罗非鱼	90.02±0.05 ^b	-1.07±0.06 ^a	2.00±0.02 ^a
白板	91.86	-0.88	1.42

注：同一列中相同小写字母表示差异不显著(P>0.05)。

蛋白膜的色泽也是表征其性能的指标之一，因此测定了鲢鱼皮、草鱼皮和罗非鱼皮胶原蛋白膜的颜色(表2)。从表中可以发现，相对于鲢鱼皮和草鱼皮制备的胶原蛋白膜，罗非鱼皮制备的胶原蛋白膜的L*、a*值和b*值更接近白板的指标，表明罗非鱼皮胶原蛋白膜颜色更接近白色。傅燕凤^[18]等也发现在相同条件下提取的草鱼皮胶原蛋白色泽比鳙鱼皮胶原更洁白。因此，本研究中三种淡水鱼鱼皮制备的胶原蛋白膜其色泽上的差异可能来源于原料的不同。然而，不管是利用哪一种鱼皮提取胶原制备的蛋白膜，其b*值都明显低于大豆分离蛋白膜(14.4)^[19]和蛋清蛋白膜(7.04)^[20]，说明利用鱼皮提取胶原制备的蛋白膜在色泽上更具有优势。

此外，利用鲢鱼皮、草鱼皮和罗非鱼皮提取胶原制备的蛋白膜在透明度、水蒸汽透过性以及水中溶解性方面都没有发现显著的差异(数据未显示)。因此，为了探究这三种胶原蛋白膜在机械性能上的差异，利用圆二色谱仪对三种鱼皮胶原溶液和胶原膜的结构进行了表征。

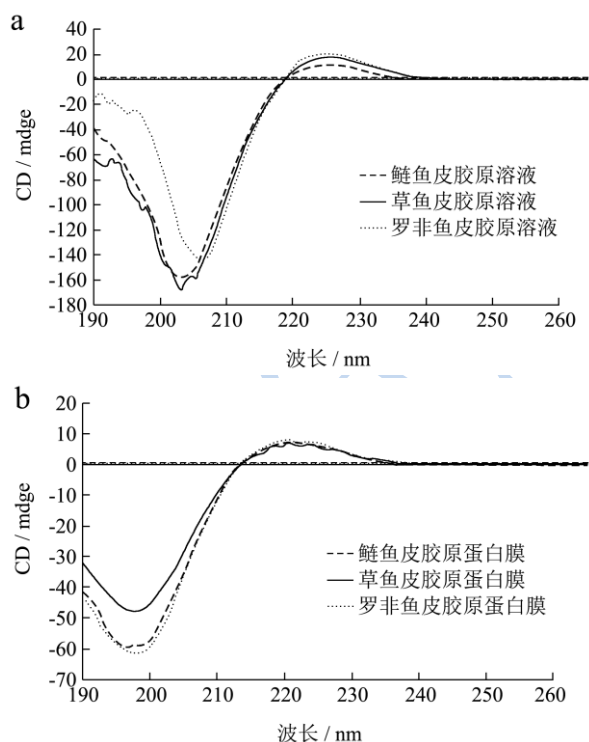


图2 鲢鱼、草鱼和罗非鱼鱼皮胶原溶液(a)和胶原蛋白膜(b)的圆二色光谱

Fig.2 CD spectra of collagen solution (a) and collagen films (b) prepared from skins of silver carp, grass carp, and tilapia

圆二色光谱(CD 光谱)常用来观察生物大分子结构和构象的变化，CD 光谱的远紫外区(185~245 nm)通常是肽键的吸收峰范围，可以反映蛋白质主链的构

象。蛋白质或多肽的二级结构不同，其 CD 光谱的吸收位置、强弱也会存在不同^[21]。因此，为了考察鲢鱼、草鱼和罗非鱼的鱼皮胶原在成膜前后二级结构的变化，利用圆二光谱仪在 190~260 nm 范围对胶原溶液及其形成的蛋白膜进行了扫描(图2)。由图2a 可以发现，三种鱼皮胶原溶液均在 222~225 nm 和 200~210 nm 附近分别出现正吸收峰和负吸收峰，这与 Pati^[4]报道的胶原的三螺旋结构的特征 CD 光谱峰型一致。通常，正负吸收峰强度的绝对值之比(the ratio of positive to negative, RPN)可以用来表示胶原溶液中三螺旋结构的螺旋程度^[22]。根据图2a 的数据，罗非鱼皮胶原的 RPN 值(0.139)高于草鱼皮胶原和鲢鱼皮胶原(分别为 0.105 和 0.097)，表明罗非鱼胶原的三螺旋结构的螺旋程度高于草鱼和鲢鱼胶原。这种趋势类似于胶原蛋白膜的 TS(图1a)。

另一方面，从胶原蛋白膜的 CD 光谱结果(图2b)中可以发现，不管哪种胶原蛋白膜在 225 nm 附近和 197nm 附近都分别出现了正吸收峰和负吸收峰，表明三种胶原蛋白膜中也都存在完整的三螺旋结构。然而，罗非鱼、草鱼和鲢鱼皮胶原蛋白膜中的三种胶原螺旋程度却比较接近(RPN 值分别为 0.133、0.138 和 0.132)，没有发现胶原的二级结构与膜的抗拉伸强度存在明显的相关性。

2.2 鲢鱼胶原 α₁ 链基因的克隆和生物信息学

分析

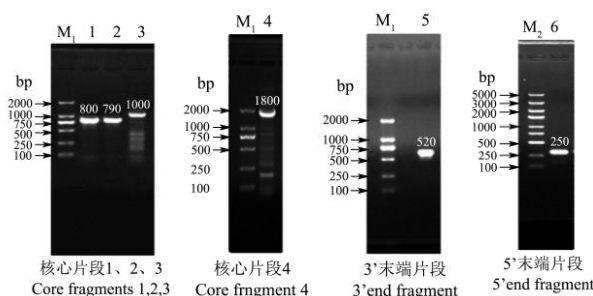


图3 鲢鱼 I 型胶原 α₁ 链(COL1A1) 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of amplified PCR fragments of silver carp collagen I α₁-chain (COL1A1) gene

注：M1: DNA Maker DL2000; M2: DNA Marker DL2500; 1, 2, 3, 4: 引物 COL1A1 F1-COL1A1 R1, COL1A1 F2-COL1A1 R2, COL1A1 F3-COL1A1 R3, COL1A1 F4-COL1A1 R4 进行 PCR 扩增的核心片段产物; 5, 6: 分别为 3'inner-3'outer 引物、5'inner-5'outer 引物和 Race 通用引物 UPM、NUP 进行 PCR 扩增的产物。

鲢鱼、草鱼和罗非鱼胶原蛋白的理化性质和结构分析表明，三种胶原的氨基酸组成和序列可能影响蛋白的成膜性能。我们研究室已经在前期研究中发现胶原中 α_1 链对成膜性能起到重要的作用，但目前基因数据库中只登录了草鱼和罗非鱼胶原的 α_1 链序列(NCBI序列号: HM363526.1 和 AB603656.1)，因此为了比较 α_1 链的一级结构对胶原成膜性能的影响，利用分子生物学方法克隆了鲢鱼胶原 α_1 链 cDNA 序列。

首先，分别利用鲢鱼皮、鳍、鳃、肾脏提取 RNA，结果从鲢鱼鳃、鳍和肾脏中提取得到完整性较好的 RNA (数据未显示)；接着，利用鲢鱼鳍的 RNA 通过

RT-PCR 得到第一链 cDNA。以 cDNA 为模板，利用 4 对特异性引物 (表 1) 对鲢鱼 I 型胶原 α_1 链基因 (*COL1A1*)核心序列分段进行 PCR 扩增，再分别以 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物和 UPM 和 NUP 通用引物对鲢鱼 *COL1A1* 的 3'和 5'末端序列进行 PCR 扩增，产物利用琼脂糖凝胶电泳进行检测 (图 3)。经过测序，分别得到 803 bp、797 bp、1082 bp、1799 bp、529 bp 和 193 bp 等 6 个基因片段。对这些序列进行拼接，去除冗余序列，得到鲢鱼 *COL1A1* cDNA 全序列为 4923bp，编码为 1448 个氨基酸，已提交至 NCBI GenBank，登录序列号为 KJ848743。

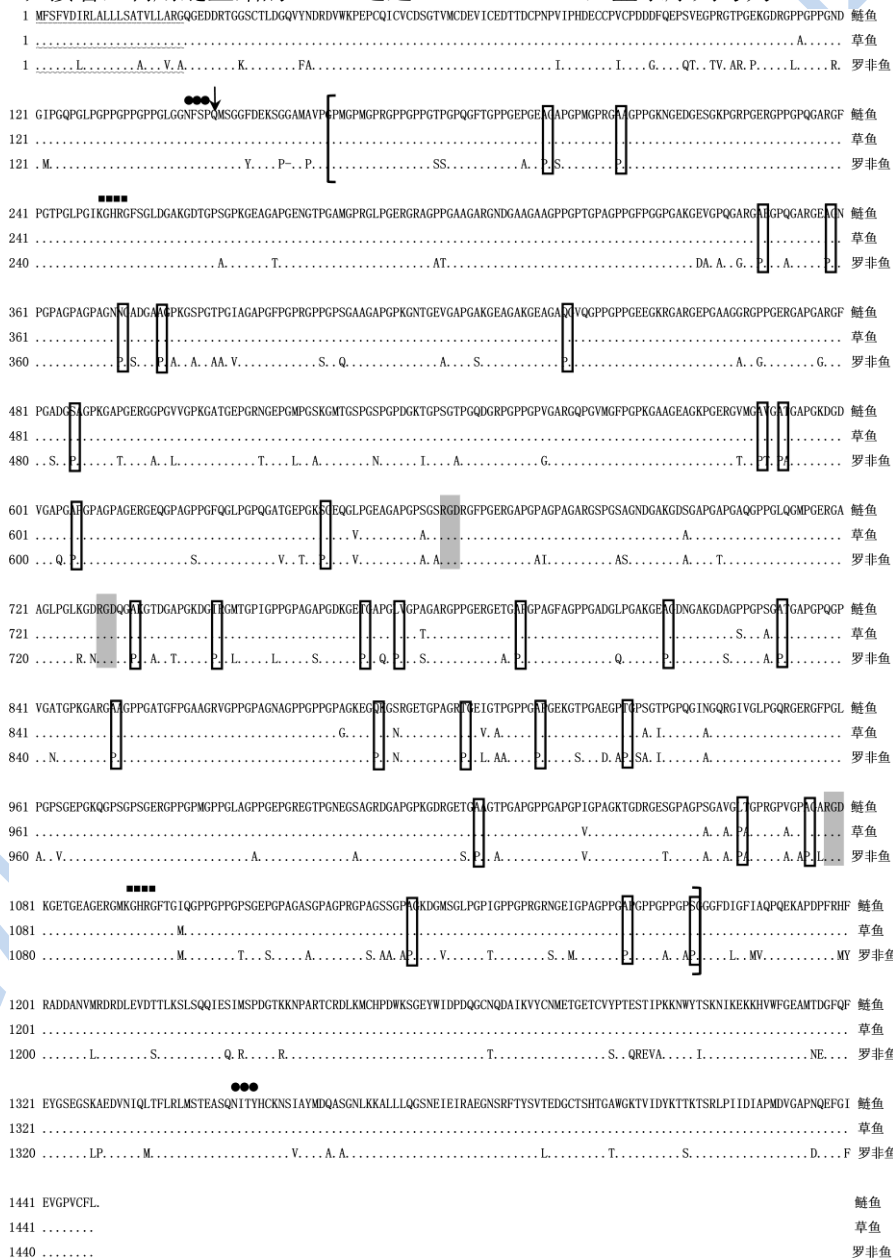


图 4 鲢鱼 *COL1A1*cDNA 推导的氨基酸序列(NCBI 序列号: KJ848743)与草鱼和罗非鱼 *COL1A1* 氨基酸序列(NCBI 序列号: HM363526.1 和 AB603656.1)的同源性

Fig.4 Homology of deduced amino acid sequences from the silver carp *COL1A1* cDNA (NCBI accession number: KJ848743) with those of grass carp and tilapia (NCBI accession number: HM363526.1 and AB603656.1)

注：波浪线表示信号肽；箭头表示 N-前肽和 C-前肽分离位点；中括号表示三螺旋结构域；阴影表示 RGD 细胞粘连位点；顶部方块表示为分子内交联形成位点；顶部黑圆点表示糖基化位点；菱形框表示三螺旋结构域内部分 Pro 差异位点。

将鲢鱼 *COL1A1* 基因 cDNA 编码的氨基酸序列与草鱼和罗非鱼 *COL1A1* 编码的氨基酸序列进行比对，结果如图 4 所示。鲢鱼 *COL1A1* 链一级结构与草鱼和罗非鱼 *COL1A1* 链都含有信号肽，C-前肽，N-前肽和三螺旋结构域。其中，N-前肽主要调控胶原纤维的直径和形态，对胶原的结构和功能有一定影响^[23]；C-前肽主要功能是促进前胶原转变为成熟胶原，对胶原三螺旋结构的形成起重要作用^[24]。不管是 N-前肽还是 C-前肽，鲢鱼和草鱼 *COL1A1* 链的氨基酸序列都具有高度同源性，但与罗非鱼 *COL1A1* 链存在较大的差异，而且可以发现罗非鱼 *COL1A1* 链的 C-前肽序列中出现两处 Pro 位点。这些可能会导致罗非鱼胶原的结构稳定性与鲢鱼和草鱼不同。在三种淡水鱼 *COL1A1* 链的三螺旋结构域内都存在两处 Lys-Gly-His-Arg 序列，它们可能是 Lys 介导的胶原纤维的交联位点，对三螺旋结构的稳定起重要作用^[25]。在三种鱼类 *COL1A1* 一级结构中还发现具有相同的糖基化位点和 RGD 细胞粘连位点。

鱼 *COL1A1* 氨基酸序列的同源性仅为 88.13%。Pro 是带有吡咯环结构的氨基酸，对胶原的三螺旋结构的稳定性起重要作用^[26]。当三螺旋结构域内 G-X-Y 序列中 X 位或 Y 位为 Pro 时，胶原结构更稳定，Pro 被 Ala、Ser、Thr、Glu、Asn、Leu 和 Ile 代替时，会导致三螺旋结构松动，从而减弱胶原的结构稳定性，进而影响胶原纤维的形状和结构^[26]。有意思的是，我们发现鲢鱼和草鱼 *COL1A1* 氨基酸序列的差异位点中，只有一个位点鲢鱼是 Leu 而草鱼是 Pro (1065 位)；而在罗非鱼 *COL1A1* 氨基酸序列的差异位点中，罗非鱼有 30 个位点是 Pro，而鲢鱼和草鱼却是其他氨基酸。因此，罗非鱼鱼皮胶原蛋白膜的机械性能明显高于鲢鱼皮和草鱼皮制备的胶原蛋白膜 (图 1)，可能是胶原 α_1 链中 C-前肽和三螺旋结构域中 G-X-Y 序列的部分氨基酸被 Pro 替代引起的。利用鲢鱼 *COL1A1* 基因序列和已报道的其他物种的 *COL1A1* 基因序列构建了系统进化树 (图 5)，结果也进一步说明了鲢鱼与草鱼聚类在同一个分支，具有较高的亲缘性和相似的进化速度，而罗非鱼则与鲢鱼和草鱼的遗传距离较远。

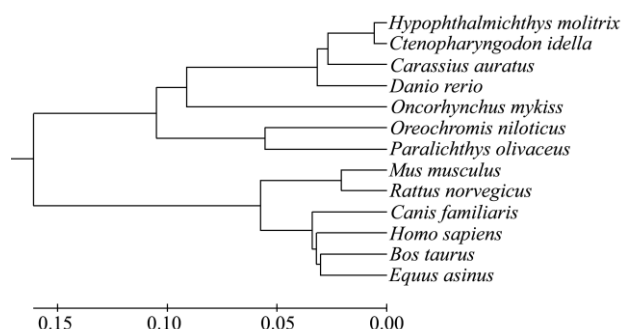


图5 鲢鱼胶原 α_1 基因序列和其他胶原 α_1 基因序列的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of silver carp *COL1A1* gene sequences and those of other species

注：Bos Taurus (NM 001034039.2)：家牛；Equus asinus (FJ594763.1)：驴；Canis familiaris (AF153062.1)：犬；Homo sapiens (NM_000088.3)：人；Mus musculus (NM_007742.3)：小家鼠；Rattus norvegicus (NM_053304.1)：褐家鼠；Carassius auratus (AB275454.1)：鲫鱼；Ctenopharyngodon idella (HM363526.1)：草鱼；Silver carp (KJ848743)：鲢鱼；Danio rerio (BC161663.1)：斑马鱼；Oncorhynchus mykiss (AB052835.1)：虹鳟鱼；Oreochromis niloticus (AB603656.1)：罗非鱼；Paralichthys olivaceus (AB196513.1)：日本牙鲆。

对三种鱼的 *COL1A1* 氨基酸序列进行同源性比对时发现，在三螺旋结构域内，鲢鱼和草鱼的 *COL1A1* 氨基酸序列的同源性高达 98.03%；然而，鲢鱼与罗非

3 结论

利用鲢鱼、草鱼和罗非鱼的鱼皮提取酸溶性胶原制备了蛋白膜，结果发现罗非鱼皮胶原蛋白膜的抗拉伸强度优于鲢鱼和草鱼的鱼皮胶原蛋白膜。圆二色谱的分析结果显示罗非鱼皮胶原溶液中的胶原的螺旋程度更高。根据三种鱼胶原 α_1 链氨基酸序列的分析结果，发现罗非鱼胶原 C-前肽和三螺旋结构域中 G-X-Y 序列中含有更多的 Pro，可能导致胶原的三螺旋结构更稳定，因此可以形成更牢固的胶原蛋白膜。

参考文献

[1] Ruban S W. Biobased packaging-application in meat industry [J]. Veterinary World, 2009, 2(2): 79-82

[2] Akturk O, Tezcaner A, Bilgili H, et al. Evaluation of sericin/collagen membranes as prospective wound dressing biomaterial [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 112(3): 279-288

[3] 熊月琴,何小维.胶原医用复合水凝胶的制备及性质研究 [J].现代食品科技,2009,25(12):1454-1457

XIONG Yue-qin, HE Xiao-wei. Preparation of the medical composite hydrogel based on collagen and its properties [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(12): 1454-1457

- [4] Pati P, Adhikari B, Dhara S. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(10): 3737-3742
- [5] Jia Y J, Wang X B, Wang H Y, et al. Biochemical properties of skin collagens isolated from black carp (*Mylopharyngodon piceus*) [J]. *Food Science Biotechnology*, 2012, 21(6): 1585-1592
- [6] 农业部渔业局.中国渔业统计年鉴 2014[M].北京:中国农业出版社,2014
Bureau of Fisheries of the Ministry of Agriculture.China fisheries yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014
- [7] 张强,王倩倩,陆剑锋,等.不同方法提取鲢鱼皮胶原蛋白的理化特性比较[J].现代食品科技,2014,30(5):104-110
ZHANG Qiang, WANG Qian-qian, LU Jian-feng, et al. Comparison of physical and chemical characteristics of collagen from silver carp skin using different extraction methods [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(5): 104-110
- [8] 李八方,郭鸣,候虎,等.胡子鲶鱼皮酸溶性胶原蛋白的理化性质研究[J].现代食品科技,2013,29(11):2580-2585
LI Ba-fang, GUO Ming, HOU Hu, et al. Physicochemical properties of acid-soluble collagen from skin of *Clarias fuscus* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(11): 2580-2585
- [9] Duan R, Zhang J J, Li J, et al. The effect of the subunit composition on the thermostability of collagens from the scales of freshwater fish [J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(1): 127-132
- [10] Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthustayenus*) [J]. *Food Chemistry*, 2005, 89(3): 363-372
- [11] Nunes P S, Albuquerque-Júnior R L C, Cavalcante D R R, et al. Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing [J]. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 2011: 1-9
- [12] 翁武银,刘光明,苏文金,等.鱼皮明胶蛋白膜的制备及其热稳定性[J].水产学报,2011,35(12):1890-1896
WENG Wu-yin, LIU Guang-ming, SU Wen-jin, et al. Preparation and thermal stability of gelatin edible films from shark skins [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(12): 1890-1896
- [13] Tang L, Chen S, Su W, et al. Physicochemical properties and film-forming ability of fish skin collagen extracted from different freshwater species [J]. *Process Biochemistry*, in press
- [14] 唐兰兰,赵阳芳,翁武银,等.pH 和双醛淀粉对罗非鱼皮明胶膜性质的影响[J].食品工业科技,2014,35(1):98-101
TANG Lan-lan, ZHAO Yang-fang, WENG Wu-yin, et al. Effect of pH and dialdehyde starch on the properties of tilapia skin gelatin films [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(1): 98-101
- [15] Wu J L, Chen S F, Ge S Y, et al. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract [J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 32(1): 42-51
- [16] Wolf K L, Sobral P J A, Telis V R N. Characterizations of collagen fibers for biodegradable film production [C]. In 13th World Congress of Food Science & Technology, Food is life, Nantes, France, September
- [17] Ninan G, Joseph J, Abubacker Z. Physical, mechanical, and barrier properties of carp and mammalian skin gelatin films [J]. *Journal of Food Science*, 2010, 75(9): 60-66
- [18] 傅燕凤,沈月新,杨承,等.淡水鱼皮胶原蛋白的提取[J].上海水产大学学报,2004,13(2):146-150
FU Yan-feng, SHEN Yue-xin, YANG Cheng, et al. Isolation of collagen from freshwater fish skin [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2004, 13(2): 146-150
- [19] Rhim J W, Gennadios A, Handa A, et al. Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films [J]. *Agriculture Food Chemistry*, 2000, 48(10): 4937-4941
- [20] Gennadios A, Handa A, Froning G W, et al. Physical properties of egg white-dialdehyde starch films [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(4): 1297-1302
- [21] 沈星灿,梁宏,何锡文,等.圆二色光谱分析蛋白质构象的方法及研究进展[J].分析化学评述与进展,2004,32(3):388-394
SHEN Xing-chan, LIANG Hong, HE Xi-wen, et al. Recent Trends and Spectroscopic Methods for Analysis of the Protein Conformation with Circular Dichroism [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2004, 32(3): 388-394
- [22] Usha R, Sreerama K J, Mandal A B. Organization of collagen in the presence of diphenylphosphorylazide (DPPA): An in vitro study [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 109(1): 121-128
- [23] Asahina K, Utoh R, Obara M, et al. Cell-type specific and thyroid hormone-dependent expression of genes of $\alpha 1(I)$ and $\alpha 2(I)$ collagen in intestine during amphibian metamorphosis [J]. *Matrix Biology*, 1999, 18(1): 283-289
- [24] Saito M, Takenouchi 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): 2817-2827
- [25] Eyre D R, Paz M A, Gallop P M. Cross-linking collagen and elastin [J]. *Annual review of biochemistry*, 1984, 53, 717-748
- [26] Persikov A V, Ramshaw J A M, Kirkpatrick A, et al. Amino acid propensities for the collagen triple-helix [J]. *Biochemistry*, 2000, 39(48): 14960-14967

现代食品科技