

文章编号: 1674—5566(2009)04—0385—06

虹鳟脑型肌酸激酶基因 cDNA 全长的克隆与序列分析

王家庆¹, 李代宗¹, 郭冉¹, 张辉¹, 宋波澜^{1,2}, 王志平¹, 钟尉方¹

(1. 河北农业大学海洋学院, 河北 秦皇岛 066003

2. 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632)

摘要:肌酸激酶 (Creatine kinase CK)能够催化磷酸基团在二磷酸腺苷 (ADP)和磷酸肌酸间的可逆性转移,在细胞能量代谢过程中发挥重要作用。以虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)为研究材料,使用 RT-PCR 和 RACE 法分离和克隆了虹鳟脑型肌酸激酶 (CKB)基因 cDNA 的全长序列 (GenBank 登录号: FJ548753)。序列全长 1 493 bp 其中 5 端非翻译区 81 bp, 3 端非翻译区 266 bp, 开放性阅读框 1 146 bp, 编码 381 个氨基酸。虹鳟鱼 CKB 蛋白存在两个重要功能结构域,分别为 EF-hand 结构域和 ATP: guanido 磷酸转移酶结构域。构建的系统进化树证实所克隆的肌酸激酶 CK 基因属于脑型肌酸激酶基因 CKB。虹鳟鱼 CKB 蛋白序列与大西洋鲑 (*Salmo salar*)的 CKB 在进化树上最先聚为一支,这与两者同属鲑科鱼类这一事实是一致的。虹鳟鱼 CKB 蛋白序列与大西洋鲑的 CKB 蛋白同源性高达 99%,与已报道的哺乳动物的 CKB 蛋白同源性均在 80% 以上相符,表明 CKB 基因在进化过程中是高度保守的,在细胞能量发生与转移过程中发挥着重要作用。

关键词:虹鳟鱼;肌酸激酶基因;RT-PCR;RACE

中图分类号: S 917 **文献标识码:** A

The cloning and analysis of CKB full length cDNA derived from *Oncorhynchus mykiss*

WANG Jia-qing¹, LI Dai-zong¹, GUO Ran¹, ZHANG Hui¹,
SONG Bo-lan^{1,2}, WANG Zhi-ping¹, ZHONG Wei-fang¹

(1. College of Ocean, Hebei Agriculture University, Qinhuangdao 066003, China;

2. Aquatic Research Institute, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: ATP levels in vertebrate cells are largely regulated by creatine kinase (EC 2.7.3.2) that reversibly catalyze the transfer of phosphate between ATP and various phosphogens. In this paper, RT-PCR and RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) methods were used for the isolation of the full length cDNA of CKB gene (GenBank accession number: FJ548753) from brain of *Oncorhynchus mykiss*. Sequence analysis revealed a 1 493 bp cDNA containing the 81 bp 5' untranslated region, 266 bp 3' untranslated region and 1 146 bp open reading frame encoding 381 amino acids. *O. mykiss* CKB has two important protein function domains, namely, EF-hand domain and ATP: guanido phosphotransferase domain. Evolutionary tree of all types of

收稿日期: 2008-12-18

基金项目: 河北省科技厅项目 (0724240011)

作者简介: 王家庆 (1981-), 男, 辽宁海城人, 讲师, 主要从事海洋动物分子生物学及生物信息学方面的研究。E-mail: jiaqing5212@

163.com, Fax: 0335-3152206, Tel: 0335-3150004

creatine kinases was then constructed and it was determined that this cDNA of *O. mykiss* creatine kinase from brain belonged to brain type CK. CKB protein of *O. mykiss* and CKB protein of *S. salar* first clustered into a branch because they all belong to the same salmon. Sequence alignment between *O. mykiss* and *S. salar* exhibited 99% identity rate of amino acid and the more than 80% identity rate of amino acid with mammal. The result indicated the CKB gene is highly conservative in the progress of evolution and plays an important role in cell energy generation and transport process.

Key words: *Oncomyichus mykiss*; creatine kinase gene; RT-PCR; RACE

肌酸激酶 (Creatine kinase, CK, EC 2. 7. 3. 2) 能够催化磷酸基团在 ADP、磷酸肌酸和 H⁺ 间的可逆性转移, 在心脏、肌肉和脑组织等的能量代谢中起重要作用^[1-3]。肌酸激酶广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物中^[4], 除了主要参与能量代谢过程外, 其可能与个体发育过程中肌肉生成相关^[5-6] 以及其催化的酶促反应的产物磷酸肌酸可以抑制 HIV 病毒在巨噬细胞中的复制等^[7]。高等脊椎动物肌酸激酶存在胞质型和线粒体型两大类, 其中胞质型包括肌肉型肌酸激酶 (CKM) 和脑型肌酸激酶 (CKB) 两种形式, 而在线粒体中存在 CKm^{tl} 和 CKm^{el} 两种类型的肌酸激酶。虹鳟 (*Oncomyichus mykiss*) 隶属鲑形目, 鲑科, 鳟属, 俗称鳟鱼。该鱼属冷水性鱼类, 具有食用价值高、生长迅速、人工繁殖简便等优点, 已成为联合国粮农组织向世界推广的四大淡水养殖品种之一。Gabber 等从虹鳟鱼睾丸 cDNA 文库中分离并克隆了一个睾丸特异高表达的肌酸激酶 cDNA 序列^[8], 但是还未见关于虹鳟鱼中是否存在肌肉型肌酸激酶和脑型肌酸激酶的报道。本研究克隆了虹鳟鱼脑中 CKB 基因的 cDNA 全长序列, 确定了虹鳟存在脑型肌酸激酶, 并进一步分析了虹鳟 CKB 基因与其他物种 CK 基因的进化关系, 为进一步研究鱼类由肌酸激酶介导的能量代谢反应奠定重要理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

虹鳟鱼购自海产品市场, 运回后立即进行脑总 RNA 抽提。

1.1.2 实验试剂

Trizol Reagen 购自 Invitrogen 公司; AMV 反转录酶、RNaseH、TdT 酶、Taq 酶、T 质粒载体、3' RACE 试剂盒购自大连宝生物 (Takara) 工程有限公司; 凝胶回收试剂盒, 连接酶购自上海生物工程有限公司。

1.1.3 引物设计

根据 GenBank 中登录的大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*)、黑青斑河豚 (*Tetraodon nigroviridis*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 等鱼类的 CKB 基因序列, 通过序列比对找到保守区设计引物 P1F: 5'-ACTCCGCGGAGCAA GAGTAC-3' 和 P1R: 5'-GGCCGCCCTCTAGACGCTTC-3'。引物 P2: 5'-CGACATCTCCAACGCCGATC-3' 和 P3: 5'-GCCGATCGTCTGGGCTTCTCTG-3' 是根据引物 P1F 和 P1R 克隆的基因片段, 使用软件 DNAstar 设计的用于 3' RACE 的特异引物; 引物 P4: 5'-GGTCATCGATCAGCTGTTC-3'、P5: 5'-GCGTCCCCACGACTGCAGT-3' 和 P6: 5'-GTGGGGTCCAGGTCATCCC-3' 是根据 P1F 和 P1R 引物克隆的基因片段设计的用于 5' RACE 的特异引物。衔接头引物 AP: 5'-CTGATCTAGAGGTACCGATCC-3'。所有引物均由 Takara 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取

取虹鳟脑组织, 用 Trizol Reagen 按说明书进行抽提总 RNA。用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.2 基因保守片段的克隆

取总 RNA 5 μg 以 OligodT-AP 5'-CTGATCTAGAGGTACCGATCC (T) 16-3' 为引物, 根据 AMV 反转

录酶使用说明进行 RT-PCR 反应,使用引物 P1F 和 P1R 扩增 CKB 基因 1 000 bp 左右的保守序列。PCR 反应体系为 25 μ L, 其中含 2.5 μ L 10 \times PCR 反应缓冲液, 2 μ mol/L 氯化镁, 200 μ mol/L dNTP, 每种引物各 0.1 μ mol/L, 0.125 U Taq 酶。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 59 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶, 使用试剂盒回收, 采用 T-A 克隆法将其克隆至 T 质粒载体, 克隆并测序。根据测序结果设计特异的 3'RACE 和 5'RACE 引物, 扩增 CKB 的 3' 和 5' 端序列。

1.2.3 3'RACE 方法

取总 RNA 5 μ g 以 oligodT-AP 为引物, 参照 AMV 反转录酶使用说明进行反转录反应, 以 AP 引物: 5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3' 和 3'RACE 特异引物 P2 进行 PCR, 反应体系按说明书进行。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。为提高扩增效率及特异性, 稀释上述 PCR 产物 10 倍后取 2 μ L 作为模板, 用引物 AP 和引物 P3 进行第二次扩增, PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离回收并克隆测序。

1.2.4 5'RACE 方法

5'RACE 原理参照文献 [9], 取总 RNA 5 μ g 以 P4 为引物, 反转录反应同 3'RACE, 然后加 RNaseH 分解 mRNA, 用 DNA 回收试剂盒回收 cDNA, 再用 TdT 酶在 cDNA 3' 端加 poly(A), 用试剂盒回收加 poly(A) 尾的 cDNA。以此为模板, 用 P5 及 oligodT-AP 为引物进行 PCR, 反应体系同 3'RACE。PCR 产物稀释 10 倍, 取 2 μ L 为模板, 用 P6 及 AP 引物, 进行 PCR, 反应体系组成同上, PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离回收并克隆测序。

1.2.5 序列拼接与生物信息学分析

用 CAP3 软件对所得到的 RT-PCR 产物、3'RACE 产物和 5'RACE 产物进行拼接。用 ClustalX、MEGA 3.0 等软件以氨基酸序列差异作为遗传距离, 分析虹鳟鱼 CKB 基因序列与其它物种的系统发生关系。用在线工具 ExPASy-PROSITE、ExPASy-Protparam 和 SeqFacts 预测蛋白质的基本理化性质与功能位点。

2 结果

2.1 CKB 基因保守片段的克隆

使用已知鱼类 CKB 的保守序列设计引物, RT-PCR 扩增得到约为 1 000 bp 的条带 (图 1-a), PCR 产物连接 T 载体转化大肠杆菌, 酶切鉴定后, 选择阳性质粒测序得到 1 071 bp 片段, 经 NCBI 的 Blastn 比对, 确定 P1F 和 P1R 的扩增产物即为虹鳟鱼脑 CKB 基因 cDNA 的部分片段。

2.2 3'RACE 与 5'RACE 结果

通过 3'RACE, 利用引物 P3 和 AP 扩增得到 400 bp 的一条带 (图 1-b), 将其转化 T 质粒载体, 双酶切, 将质粒测序, 得到 398 bp 片段。根据 5'RACE 操作流程, 最后获得 500 bp 左右的特异条带 (图 1-b), 转化 T 质粒载体, 酶切鉴定后, 将阳性质粒测序。测序结果显示片段大小为 453 bp。

2.3 序列的拼接与蛋白功能位点预测分析

根据 3'RACE 和 5'RACE 的结果, 使用 CAP3 软件把 3' 和 5' 进行拼接, 得到虹鳟鱼 CKB cDNA 序列

(图 2), 结果显示虹鳟鱼 CKB cDNA 全长 1 493 bp, 其中 5' 端非翻译区 (5'UTR) 长 81 bp, 3' 端非翻译区 (3'UTR) 长 266 bp, 开放阅读框长 1 146 bp, 编码 381 个氨基酸。预测的蛋白质分子量为 42.7 ku, 理论等电点 (pI) 为 5.39。用 ExPASy-PROSITE 工具预测虹鳟鱼 CKB 蛋白存在两个重要功能结构域, 分别为

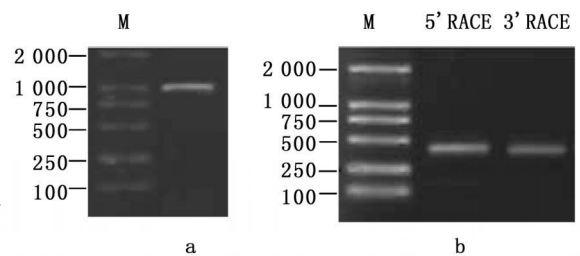


图 1 RT-PCR 产物琼脂糖电泳

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

M: DNA 分子量标准, DL2000 Marker 图 1-a 为引物 P1F 与 P1R 扩增产物, 图 1-b 为 3'RACE 与 5'RACE 的 PCR 扩增产物

EF-hand结构域(aa¹⁰⁹⁻¹²¹)和ATP:guanido磷酸转移酶结构域(aa²⁸³⁻²⁸⁹)(图2)。SeqFacts工具显示该蛋白存在两个抗原位点"RGFCLPPHCSR"(aa¹³⁸⁻¹⁴⁸)和"QQLDDHFLFDKPVSPILLAS"(aa¹⁸⁵⁻²⁰⁵)。本文所克隆的基因序列已提交GenBank数据库(登录号:FJ548753)。

```

ATAAGCGTTGGTGTGATCGTTCCTTGTCGAAAGGGATTTTGTGTCTTTCCCAAAGAAAA 60
CGTCTAAGGTCAAAGAAATCATGOCTTTCGGTAAACACCCACAACAAGCTGAAGATGAAC 120
M P F G N T H N K L K M N 13
TACTCCCGGAGCAAGAGTACCCCGACCTGAGCCAGCATAACAACCACATGGCCAAGGTG 180
Y S A E Q E Y P D L S Q H N N H M A K V 33
CTCACTOCAGAGATGTACTOCAACTTGGCGGACAAGGAAACTCCAAGTGGATTACAGTG 240
L T P E M Y S N L R D K E T P S G F T V 53
GATGATGTCATTCAAATGGGGTTGATAACCCAGGCCACCCCTTCATCATGACAGTGGGC 300
D D V I Q T G V D N P G H P F I M T V G 73
TGTTGCGCCGGAGACGAGGAGACGTACGAGGTGTTCAAGGAGCTGCTGGACCCCGTCATC 360
C V A G D E E T Y E V F K E L L D P V I 93
GAAGATGGCCATGGTGGATACAAGOCCTCAGATAAACACAAAGACCCGACCTGAACCCAGAC 420
E D R H G G Y K P S D K H K T D L N P D 113
AAOCTTGTGGGTGGGGATGACCTGGACCOCAACTACGTCCTGAGCTCTAGAGTGAGAACT 480
N L V G G D D L D P N Y V L S S R V R T 133
GGTAGGAGCGTCCGGCTTCTGCTCCOCCACACTGCAGTCGTGGGGAGCGCCCGCC 540
G R S V R G F C L P P H C S R G E R R A 153
ATTGAGAACATGGCCATCGAAAGTCTAGCATCATTGGATGGGGACCTCAATGGCCAGTAT 600
I E N M A I E S L A S L D G D L N G Q Y 173
TAOCCCTGAAGAACATGACAGACGACGAGCAGCAACAGCTGATCGATGACCACTTCCTG 660
Y A L K N M T D D E Q Q Q L I D D H F L 193
TTOGACAAACCTGTTTCCOCCCTGCTGCTGGCGTCCGGATGGGCCGAGACTGGCCCGAT 720
F D K P V S P L L L A S G M G R D W P D 213
GGCAGGGCATCTGGCACAAGCATGGCAAGACCTTCCCTGGTGTGGGTGAAAGAGGAAGAC 780
G R G I W H N D G K T F L V W V N E E D 233
CATCTAOGGGTCATCTCTATGCAGAAGGGCGGCAACATGAAGGAGGTGTTCCACCGTTTC 840
H L R V I S M Q K G G N M K E V F H R F 253
TGCACAGGCCTCACAAGATCGAGAGCCTGTTCAAGGACAAGGTCATGAGTTCATGTGG 900
C T G L T K I E S L F K D K G H E F M W 273
AAGAGCACCTGGGTTACGTGCTCACCTGTCCCTCCAACTGGGCACAGGGCTGCGCGCC 960
N E H L G Y V L T C P S N L G T G L R A 293
GGGTGCACGTCAGCTGCCAACGTCAGCAAGCACGAGAAGTTTGGTGAGATCCTCAAG 1020
G V H V K L P N V S K H E K F G E I L K 313
AGGTTGAGGCTGCAGAAGCGTGGCACAGCCGGCGTGACACTGCAGCACTAGCCGGCGTC 1080
R L R L Q K R G T G G V D T A A V G G V 333
TTOGACATCTCCAACCGGATCGTCTGGCTTCTCTGAGGTGGAGCTGGTGCAGATGGTT 1140
F D I S N A D R L G F S E V E L V Q M V 353
GTGACGGCGTCAAGACCCCTGTCGAGATGGAGAAGGTCTAGAGGGCCGGCCAGTCTCT 1200
V D G V K T L V E M E K R L E G G Q S F 373
GAGACCTGATCCCGACCAGAACTGAAGGTTCCTACTCTAGAACCTTATGACCTCTTCT 1260
D D L M P D Q K * 381
CTCATCTCTCCCTCTCACCAGTATCTCCOCCCTTGCTCAAAAAACAATAATCTTAACTAC 1320
ATCAAGGAAATACACTCCGCCAATGCGTTTGTGGCACTAAAGTTAGACAAGTCTTCCA 1380
TCTGTGTGATGAAGGATTTGTATCTCAAAATGCTGTCTGTGTGCAAAATATTGGATGGAT 1440
CTTAACCTGAAATATAAAGTCTCTTTGCCCCATTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1493

```

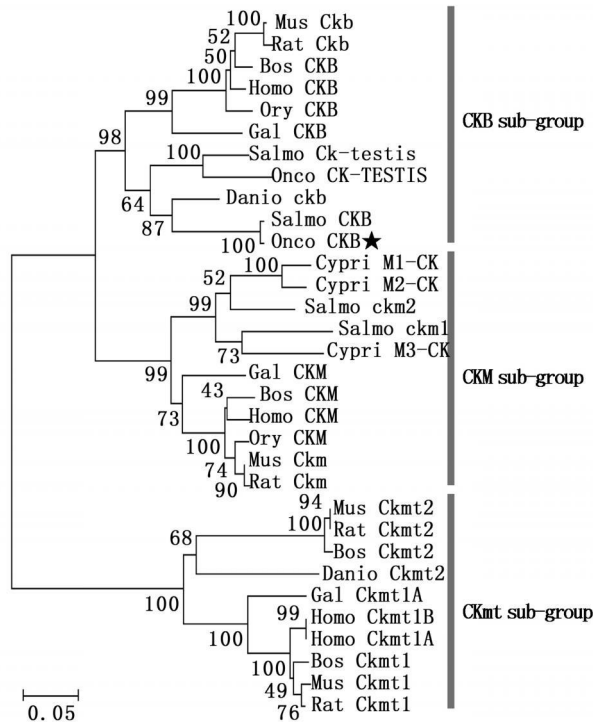
图2 虹鳟鱼CKB cDNA及其推导的氨基酸序列

Fig 2 The cDNA and deduced amino acid sequences of the *O. mykiss* CKB gene

* 表示终止密码子,下划线表示蛋白抗原位点,3'端 Poly(A)信号(AATAAA)用加粗字母表示

2.4 同源比对与系统进化树构建

经 BLASTP程序同源性比对,虹鳟 CKB 蛋白序列与大西洋鲑 (*Salmo salar*)的 CKB 蛋白同源性为 99%,与斑马鱼 (*Danio rerio*)的 CKB 蛋白同源性为 90%,与非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)的 CKB 蛋白同源性为 85%,与人 (*Homo sapiens*)的 CKB 蛋白同源性为 84%。用 ClustalX 和 MEGA 3.0 软件构建系统发育树,显示不同动物物种间的几种类型的肌酸激酶的进化及其亲缘关系 (图 3)。



Mus Ckb (小鼠 *Mus musculus*, NM_021273), Rat Ckb (大鼠 *Rattus norvegicus*, NM_012529), Bos CKB (牛 *Bos taurus*, BT020708), Homo CKB (人 *Homo sapiens*, NM_001823), Ory CKB (兔 *Oryctolagus cuniculus*, NM_001082261), Gal CKB (鸡 *Gallus gallus*, NM_205310), Salmo Ck-testis (大西洋鲑 *Salmo salar*, NM_001140683), Onco Ck-testis (*Oncorhynchus mykiss*, 虹鳟 NM_001124715), Danio ckb (斑马鱼 *Danio rerio*, NM_173222), Salmo CKB (大西洋鲑 *Salmo salar*, NM_001139778), Cypri M1-CK (鲤鱼 *Cyprinus carpio*, AF055288), Cypri M2-CK (鲤鱼 *Cyprinus carpio*, AF055289), Salmo ckm2 (大西洋鲑 *Salmo salar*, NM_001139716), Salmo ckm1 (大西洋鲑 *Salmo salar*, NM_001139715), Cypri M3-CK (鲤鱼 *Cyprinus carpio*, AF055290), Gal CKM (鸡 *Gallus gallus*, NM_205507), Bos CKM (牛 *Bos taurus*, BT021173), Homo CKM (人 *Homo sapiens*, NM_001824), Ory CKM (兔 *Oryctolagus cuniculus*, NM_001082239), Mus Ckm (小鼠 *Mus musculus*, NM_007710), Rat Ckm (大鼠 *Rattus norvegicus*, NM_012530), Mus Ckmt2 (小鼠 *Mus musculus*, NM_198415), Rat Ckmt2 (大鼠 *Rattus norvegicus*, NM_001127652), Bos Ckmt2 (牛 *Bos taurus*, NM_001034656), Danio Ckmt2 (斑马鱼 *Danio rerio*, BC171364), Gal Ckmt1A (鸡 *Gallus gallus*, NM_204182), Homo Ckmt1B (人 *Homo sapiens*, NM_020990), Homo Ckmt1A (人 *Homo sapiens*, NM_001015001), Bos Ckmt1 (牛 *Bos taurus*, NM_174275), Mus Ckmt1 (小鼠 *Mus musculus*, NM_009897), Rat Ckmt1 (大鼠 *Rattus norvegicus*, NM_001012738)。

图 3 CK 蛋白家族系统发育树

Fig 3 Phylogenetic tree of CK protein families

3 讨论

脊椎动物存在肌肉型 CK、脑型 CK 以及线粒体型的 CKmt 等多种肌酸激酶。本研究利用 RT-PCR 结合 RACE 方法成功地从虹鳟鱼脑组织中分离到了 CKB 基因,序列分析及同源性分析表明该基因 cDNA 全长共 1 493 bp 其中 5'UTR 长 81 bp 3'UTR 长 266 bp ORF 长 1 146 bp 编码 381 个氨基酸,与大西洋鲑的 CKB 蛋白同源性高达为 99%,与已克隆的哺乳动物^[10-11]的 CKB 蛋白同源性均在 80% 以上,这显示 CKB 基因在进化过程中是高度保守的,暗示其功能重要性。虹鳟鱼 CKB 蛋白包含两重要功能结构域,一个是 EF hand 结构域,暗示其具有钙结合蛋白的特性^[12],另一个是 ATP: guanido 磷酸转

移酶结构域,其功能是催化磷酸基团在 ATP和各种磷酸肌酸间的可逆性转移^[13-14]。构建系统发育树显示脊椎动物的几种肌酸激酶明显分为 3个亚群(sub-group),第一亚群为脑型肌酸激酶(CKB),第二亚群为肌肉型肌酸激酶(CKM),第三亚群为线粒体型肌酸激酶(CKmt),各个亚群的分支点处具有非常高的置信值,分别为 98、99和 100,说明亚群划分可信度高,这 3个亚群的划分暗示同一物种不同类型肌酸激酶间的差异较不同物种的同一类型亚单位间的差异更大^[15-16]。虹鳟鱼 CKB与大西洋鲑和斑马鱼的 CKB亲缘关系最近,然后依次是其它动物的 CKB、CKM 亚群和 CKmt亚群,这不仅反映了各物种进化关系的远近,也进一步确认了所克隆的序列确为虹鳟脑型 CKB基因。值得注意的是第一亚群中,存在两个睾丸特异表达的 CK,大西洋鲑 *Salmo Ck-testis*和虹鳟 *Onco Ck-testis*(图 3)。脊椎动物睾丸组织是一个大量产生 ATP的部位,经常发现存在大量的蛋白变异体^[8],因此推测睾丸特异表达的 CK可能来源于脑型 CK的变异体。

由于肌酸激酶能催化有 ATP和肌酸的磷酸基团的转移反应,能在一定时间里给激烈运动的肌肉细胞提供能量,同时又能维持各个组织中 ATP的恒定水平,因此,在鱼类中克隆并进一步研究 CKB基因,对于揭示高等动物中 CKB基因的进化历程,研究这些基因的功能,透视高等动物的肌肉细胞能量供应与转移机制及鱼类与其他高等动物肌酸激酶类型差异等都具有重要的理论和实践意义。

参考文献:

- [1] Spindler M, Niebler R, Renkes H, et al. Mitochondrial creatine kinase is critically necessary for normal myocardial high-energy phosphate metabolism [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, 283 (2): 680-687.
- [2] Ventura-Clapier R, Kuznetsov A, Veksler V, et al. Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity [J]. *Mol Cell Biochem* 1998, 184(1-2): 231-247.
- [3] Hammerschmidt S M, Bell N, Büchler H, et al. Acute changes of myocardial creatine kinase gene expression under β -adrenergic stimulation [J]. *Biochimica Biophysica Acta* 2000, 1502: 471-480.
- [4] Watts D C. Evolution of phosphagen kinases [M] // Schoffeniels E. *Biochemical evolution and the origin of life*. Amsterdam: North-Holland 1971: 150-173.
- [5] Olson E N, Perry W M, Schulz R A. Regulation of muscle differentiation by the MEF family of MADS box transcription factors [J]. *Dev Biol* 1995, 172: 2-14.
- [6] Weintraub H, Davis R, Tapscott S, et al. The myoD gene family: Nodal point during specification of the muscle cell lineage [J]. *Science* 1991, 251: 761-766.
- [7] Mohana Rao J K, Bujacz G, Wolowar A. Crystal structure of rabbit muscle creatine kinase [J]. *FEBS Lett* 1998, 439: 133-137.
- [8] Gaber A T, Winkler R J, Dixon G H. A novel creatine kinase cDNA whose transcript shows enhanced testicular expression [J]. *Biochim Biophys Acta* 1990, 1087(2): 256-268.
- [9] 曹丽萍, 俞菊华, 殷国俊. 奥利亚罗非鱼 SOX9基因 cDNA全长的克隆及分析 [J]. *上海水产大学学报*, 2008, 17(1): 6-11.
- [10] Putney S, Herlihy W, Royal N, et al. Rabbit muscle creatine kinase phosphokinase cDNA cloning, primary structure, and detection of human homologues [J]. *J Biol Chem* 1984, 259: 14317-14320.
- [11] Benfield P A, Zivin R A, Miller L S, et al. Isolation and sequence analysis of cDNA clones coding for rat skeletal muscle creatine kinase [J]. *J Biol Chem* 1984, 259: 14979-14984.
- [12] Heizmann C W, Hunziker W. Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights [J]. *Trends Biochem Sci* 1991, 16: 98-103.
- [13] Stein L D, Ham D A, David J R. A cloned ATP: guanidino kinase in the trematode *Schistosoma mansoni* has a novel duplicated structure [J]. *J Biol Chem* 1990, 265: 6582-6588.
- [14] Bessman S P, Carpenter C L. The creatine-creatine phosphate energy shuttle [J]. *Annu Rev Biochem* 1985, 54: 831-862.
- [15] 石耀华, 刘军, 夏建红, 等. 银鲫肌酸激酶 M3-CK cDNA的克隆及其表达特征 [J]. *动物学报*, 2003, 49(5): 637-645.
- [16] Qin W, Khuchua Z, Cheng J, et al. Molecular characterization of the creatine kinases and some historical perspective [J]. *Mol Cell Biochem* 1998, 184: 153-167.