

鳊肌肉生长抑制素 Myostatin cDNA 克隆与组织表达分析

张敏 赵金良* 邓燕飞

(农业部水产种质资源与利用重点开放实验室 上海海洋大学 上海 201306)

摘要:利用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增法 (RACE) 克隆了鳊 (*Siniperca chuatsi*) 肌肉生长抑制素 (myostatin, MSTN) cDNA 序列,并分析了该基因的结构特征和亲缘关系。鳊 MSTN cDNA 序列全长 2 627 bp,包括 5' 端非翻译区 117 bp、3' 端非翻译区 1 376 bp 和开放阅读框 (ORF) 1 134 bp,共编码 377 个氨基酸,含 22 个氨基酸的信号肽。鳊 MSTN 具有脊椎动物 MSTN 的共同序列特征,含有 1 个蛋白酶水解位点 RARR 和 9 个保守的半胱氨酸残基。脊椎动物 MSTN 氨基酸序列的亲缘关系分析表明,鳊与其他鱼类聚为一支。RT-PCR 分析表明,鳊 MSTN 在成体不同组织中的表达情况不同,其中,卵巢、肾、眼、肌肉、心、脑、皮肤和胃中有表达,肝胰脏未见表达。

关键词:鳊;肌肉生长抑制素;cDNA 末端快速扩增;组织表达

中图分类号:Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2010)03-01-10

Cloning of Myostatin cDNA and its Tissue Expression in the Mandarin Fish *Siniperca chuatsi*

ZHANG Min ZHAO Jin-Liang* DENG Yan-Fei

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization Ministry of Agriculture,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract:The myostatin cDNA was cloned by means of RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE), and its structural characteristics and phylogenetic relationship were also analyzed in the Mandarin Fish, *Siniperca chuatsi*. The full length of mandarin fish MSTN cDNA was 2 627 bp and it contained a 117 bp 5'-untranslated region, a 1 376 bp 3'-untranslated region and a 1 134 bp open reading frame (ORF), which encoded 377 amino acids with a putative signal peptide of 22 amino acids. A conservative hydrolytic site, RARR and 9 cysteine residues, the common domains of vertebrate MSTNs, were identified in mandarin fish MSTN. Mandarin fish was grouped into the same branch as other fishes in vertebrate MSTN phylogeny. RT-PCR analysis demonstrated that the mandarin fish MSTN transcript expression varied among different tissues. Its expression was detected in ovary, kidney, eye, muscle, heart, brain, skin and stomach, but not in liver.

Key words:*Siniperca chuatsi*; Myostatin; Rapid amplification of cDNA ends; Tissue expression

基金项目 上海市科委基础研究重点项目 (No. 09JC1406900),上海市重点学科建设项目 (Y1101);

* 通讯作者, E-mail: jlzhao@shou.edu.cn;

第一作者介绍 张敏,男,硕士研究生;研究方向:水产动物遗传育种;E-mail: zmyjjzmyjj@163.com。

收稿日期:2009-10-28,修回日期:2009-12-20

肌肉生长抑制素 (myostatin, MSTN), 又称生长分化因子 8 (growth differentiation factor 8, GDF8), 是转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 超家族成员^[1]。MSTN 也像其他成员一样首先被翻译成前多肽原 (pre-propolypeptide), 包含信号肽序列、多个保守的半胱氨酸残基和一个 RXXR 蛋白酶切位点。自 1997 年在小鼠 (*Mus musculus domesticus*) 中发现该基因以来, 大量实验证据表明, MSTN 对哺乳动物骨骼肌的发育和生长有负调控作用, 该基因的缺失可导致骨骼肌增生^[2]。在小鼠中, MSTN 基因敲除使小鼠肌肉生长旺盛, 肌纤维增生或肥大^[1]; 在牛 (*Bos frontalis*) 和狗 (*Canis familiaris*) 中, 该基因突变导致的功能失活, 使其肌肉产量明显增加^[3-4]。目前, 一些鱼类 MSTN 基因也被相继克隆: 斑马鱼 (*Danio rerio*)^[5]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[6]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[7]、莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)^[8]、白鲈 (*Morone americana*)^[9]、条纹石鲷 (*M. saxatilis*)^[9]、金头鲷 (*Sparus aurata*)^[10]、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[11]、波纹短须石首鱼 (*Umbrina cirrosa*)^[12]、鲈 (*Lateolabrax japonicus*)^[13]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[14]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[15]、加州鲈 (*Micropterus salmoides*)^[16]、眼斑拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*)^[17] 和几种鲆鲽鱼类^[18] 等。

脊椎动物中, 鱼类具有特殊的生长模式。鱼类生长具有阶段性, 大部分种类性成熟后仍保持继续生长。由于 MSTN 对动物肌肉生长的调控作用, 对重要养殖鱼类进行遗传改造以控制 MSTN 的表达或生物活性, 将为水产养殖产量提高提供重要途径。鳊 (*Siniperca chuatsi*) 是我国传统名贵淡水经济鱼类。本研究对鳊 MSTN 基因的克隆、结构特征及组织特异性表达进行了初步分析, 为鳊肌肉发育、生长的调控关系研究奠定分子基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 鳊共 3 尾, 购于上海市浦东新区果园农贸市场, 平均体重 0.56 kg。

总 RNA 抽提试剂 TaKaRa RNAiso Reagent、RT-PCR 试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (含自带引物 M13 Primer M4、Oligo dT-Adaptor Primer)、pMD19-T 载体系统购自宝生物工程 (大连) 有限公司; BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 购于 BD Biosciences (含自带引物 UPM); DNA Ladder、Loading Buffer、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、大肠杆菌 DH5 α 购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 肌肉总 RNA 的提取 活体解剖, 取肌肉 100 mg 于 1.5 ml 离心管中, 加入 1 ml RNAiso reagent 试剂, 经匀浆、氯仿抽提、异丙醇沉淀、75% 酒精洗涤, 用适量 0.01% DEPC 处理过的水溶解总 RNA。变性琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。

1.2.2 引物设计与合成 根据 GenBank 中已报道鱼类 MSTN 编码区的保守序列, 设计简并引物 F1 和 R1 扩增鳊 MSTN 部分片段序列。再根据部分片段序列设计 RACE 特异性引物, 其中 F2、F3 用于 3' RACE; R2 用于 5' RACE。根据获得的 MSTN 全长序列, 在第 2 和第 3 外显子上分别设计半定量 RT-PCR 引物 F4 和 R4。用于半定量 RT-PCR 内标 β -actin 基因的引物为 F5 和 R5。所用引物 (表 1) 均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

表 1 引物序列及退火温度

Table 1 Nucleotide sequences and annealing temperature of oligonucleotide primers

引物 Primer	序列 Nucleotide sequence	退火温度 (°C) Annealing temperature
F1	5'-CYGACGGGAACAGGCACATAC-3'	62
R1	5'-TGAGCGGATAGCGYCAGCACC-3'	62
F2	5'-ACTGGGGCATCGAGATTAACG-3'	55
F3	5'-CCTGGTGAACAAGGCAAATCC-3'	55
R2	5'-CAACTCAAGAGCATCCACAACGGTC-3'	68
F4	5'-CAGACGGGAACAGGCACATAC-3'	62
R4	5'-TGAGCAGATACGGGCAGCACC-3'	62
F5	5'-ATCGCCGCACTGGTTGTTGAC-3'	58
R5	5'-CCTGTTGGCTTTGGGTTTC-3'	58

1.2.3 RT 及 RACE 扩增 MSTN cDNA 部分片段 RT-PCR 和 3' RACE 按照 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0 说明书进行;5' RACE 按 BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书进行。

1.2.4 PCR 产物克隆测序及生物信息学分析

RACE 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行纯化,纯化后的 RACE 产物与 pMD19-T 载体连接构建重组质粒,转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,经 LB 平板(含 Amp⁺、IPTG 和 X-gal)培养后,筛选重组子进行插入片段检测,序列测定由上海英俊生物技术有限公司完成。

应用 Blastx 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)进行蛋白质相似性搜索;ORF Finder 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)分析开放阅读框(ORF)并推导氨基酸序列;Signal P 3.0 server 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>)进行信号肽分析;MEGA 4.1 软件构建 NJ 亲缘关系树。

1.2.5 RT-PCR 分析 MSTN 在不同组织中的表达特征 3 尾鳊皮肤、卵巢、肾、眼、肝胰脏、胃、肌肉、心、脑共 9 个组织的总 RNA 的提取同前,总 RNA 经 DNase I (RNase free) 处理,平衡其起始浓度后,按 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0 试剂盒说明书进行反转录。以各组织

的反转录产物为模板,F4 和 R4 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μ l,PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,62 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。以 F5 和 R5 为引物,PCR 扩增 β -actin 作为检测基因表达的内标。取 4 μ l RT-PCR 产物,琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。

2 结果

2.1 鳊肌肉生长抑制素 cDNA 序列及氨基酸序列 鳊肌肉总 RNA 经反转录,引物 F1 和 R1 扩增,获得一条目的带(图 1),该片段经测序后

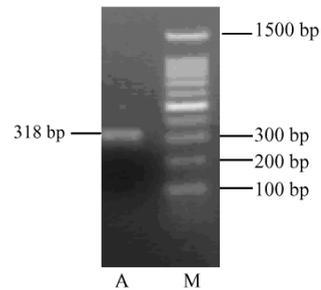


图 1 鳊肌肉生长抑制素 cDNA 核心片段扩增结果

Fig.1 Core cDNA fragment of *Siniperca chuatsi* myostatin

A:核心片段扩增产物;M:100 bp 分子量标记。

A: Core fragment product; M: 100 bp molecular marker.

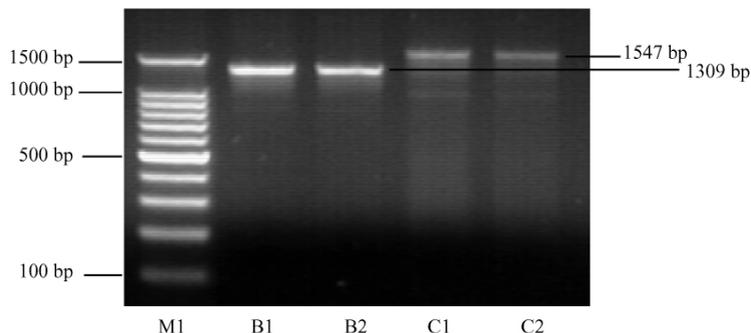


图 2 鳊肌肉生长抑制素 3' RACE 和 5' RACE 扩增结果

Fig.2 3' RACE and 5' RACE products of *Siniperca chuatsi* myostatin gene

M1:100 bp 分子量标记;B1,B2:5' RACE 扩增产物;C1,C2:3' RACE 扩增产物。

M1: 100 bp molecular marker; B1,B2: 5' RACE product; C1,C2: 3' RACE product.

```

-117                                     ggcgaccccatatgcctatcaatgtgggacatta
atccaaacccttccagtcgctatcagatccagcacacagcaaggatctttttgtaaacaggacctcacgcttagagaca
1  ATGCACCTGCTCAGATTTGACGTATCTAGTTTGTGATGCTTTGGGTCAGTCGTTTGTAGTGACCAAGAGACGCCACCAGCAGCCCTCCGCC
  M H L S Q I V T Y L S L L I A L G P V V L S D Q E T H Q Q Q P S A
100 ACCAGCCAGAAACACCGAGCAGTCGCGCACCTGCGAGGTCGCGCAGCAGATAAAACATGCGATTAACCCGATAAAAATCAGATTTGAGCAAA
  T S P E D T E Q C A T C E V R Q Q I K T M R L N A I K S Q I L S K
199 CTGCAATGAAAGAAAGCTCTATATCAGCCGAGATATAGTGAAGCAGCTCTGCCAAAGCGCCCGCTGCAGCAGCTTCTGCAGCAGTACGACGTG
  L R M K E S S Y I S R D I V K Q L L P K A P P L Q Q L L D Q Y D V
298 CTGGGAGATGACAAAGGATGTGGCTATGAGGAGGACGATGAGATGCCATCACGGAGACAATAATGATGATGGCCATGAACCCGAGTCCATCGTC
  L G D D N K D V A M E E D D E H A I T E T I M M M A T E P E S I V
397 CAGGTGGATGGGAACCAAGTGTCTTTTCTCTTTAATCAAAGTTTCAAGCCAATCGCATACTCCGGCTCAGCTCTGGGTGTATCTGCCGCCG
  Q V D G E P K C C F F S F N Q K F Q A N R I L R A Q L W V Y L R P
496 GCGGCCAGGCGACCACCGTGTCTGCAAAATCTCCCGCTGATGCCGGTCACAGCGGGAACAGGCACATACGCATCCGCTCCCTGAAGTCGACGTG
  A A E A T T V F L Q I S R L M P V T D G N R H I R I R S L K I D V
595 AATGCTGGGGCCGCTCTTGGCAAAGTATAGACGTCAAACAAGTTGACTGTGTGGCTGCGGACGCCGAGACCAACTGGGCATCGAGATTAACGCC
  N A G A G S W Q S I D V K Q V L T V W L R Q P E T N W G I E I N A
694 TTCGATCGAGTGAATGACTTGGCCGTGACCTCCGAGAGCTGGAGAGGAAGACTGCAACCATTATGAGGTGAAGATCTCAGAGGGCCCCAAG
  F D S S G N D L A V T S A E P G E E G L Q P F M E V K I S E G P K
793 CGGCCAGAAAGACTCAGGCTGGACTGTGACGAGAACTCTCAGAGTCCGGTGTGCCCTATCTGTCTCAGTGGACTTTGAAGACTTTGGCTGG
R A R R D S G L D C D E N S P E S R C C R Y L L T V D F G E D F G W
892 GACTGGATTATGCCCAAAGCGCTACAAGCCAACATTGCTCCGGGAAGTGGAGTACATGCATTACAGAAGTACCCGCACCCACCTGGTGAAC
  D W I I A P K R Y K A N Y C S G K C E Y M H L Q K Y P H T H L V N
991 AAGCAAATCCAGAGGACCGCTGCCCCCTGCTGTACCCCAAGATGTCGCCCATCAACATGCTCTACTTTAACCGAAAAGACAGATCATCTAT
  K A N P R G T A G P C C T P T K M S P I N M L Y F N R K E Q I I Y
1090 GGCAAGATCCCTTCCATGGTGGTGGACCGTTGTGGATGCTCTTGA
  G K I P S M V V D R C G C S ★
1135 gttgggacggagagcctggcgagagggaggggaggcggaggggctctggctcagtcggcctccagcttccagctttttg
acacaaccaatccaccagtccagtgctttcccgagaaacacggtagaatagaaccagagtagacgccacaacagccgca
ccttcccgagggcagcgtttatagcttctacttttcttccctccagtgaaatcttagccatagaggcttgaagttaga
tggtgacggaacacacatacacacacatgctggaccttggagtgaatgtagacagacactatcaaaagtatccaaaaact
ttttttccctctgtctcgtgttctgtgtgtgtacattatacaaacatgccgacaataataactctgacgccacctac
tccagtcactccactccagccaacatacaagctactacactttttgctaagctatattgtttgtgataatcatttgtcaa
gttgtgttttcagagtgaaaccaggaatcctcatggactttttgaaaggcttggaaaaacacaaatggggactcttaga
gtgatattcacctgtgtagaataatgttttagtacaggtctatgagaatcgtgaaaagatgaaaagttggctgcgagg
caaaccttagtcacagttataccaaccagccataaatfacaacgttgacagatcattagcttccctactggatca
aactttgagttgcaatttagttcttgatcaaccatactgagaacgtatgaagaaaagtgtagacggtgacatgctggt
gatcctgtggacacaacatgttccaccaggtgaagtggcactttaggtcttgacaggtcttcatgtactttatacatac
acgacagcacacttgtgagaggagcttctgctcagtcataatcttaactttccagcagaaaagcgtgacctgcccga
tacacttgaatatctcactgttaattcacattcctggacagaaggactgaaactgaaggcacaataatgacgcttaca
gatgcaaaaaaacgtgtttaagacagagaaaaatggattgaaatgtgaggtcatgcttaaacctgtcttactttcagc
acagtttgactatggcacaccaatagaagaatgggtgctacaaaagtgaaaaaactaattttgttatgtttgacct
tcgtagtgctacatatgccacctttccataggagttgcctttctaaaccactgttggtaaatgtataaaaccacaatt
aaagcctttcatagcgtcaataaaaaagtgcccatgaaccacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图3 鳊肌肉生长抑制素 cDNA 和氨基酸序列

Fig. 3 The cDNA and deduced amino acid sequence of *Siniperca chuatsi* myostatin

小写字母代表 3'、5' 端非翻译区；大写字母部分为编码区，上面为核苷酸序列，下面为氨基酸序列，★表示终止密码子；多聚腺苷酸加尾信号 (ataaaa) 用方框标出；蛋白酶水解位点 (RARR) 用阴影框标出；保守的半胱氨酸残基用阴影标出。

3'-, 5'-untranslated regions are shown as lowercases; Coding region is shown as uppercases, where the upper sequence indicates the nucleotide and the lower shows the amino acids. Asterisk indicates stop codon; Putative polyadenylation signals (ataaaa) are boxed; The conservatively hydrolytic site (RARR) are marked with shadow boxes; The conservative cysteine residues are shaded.

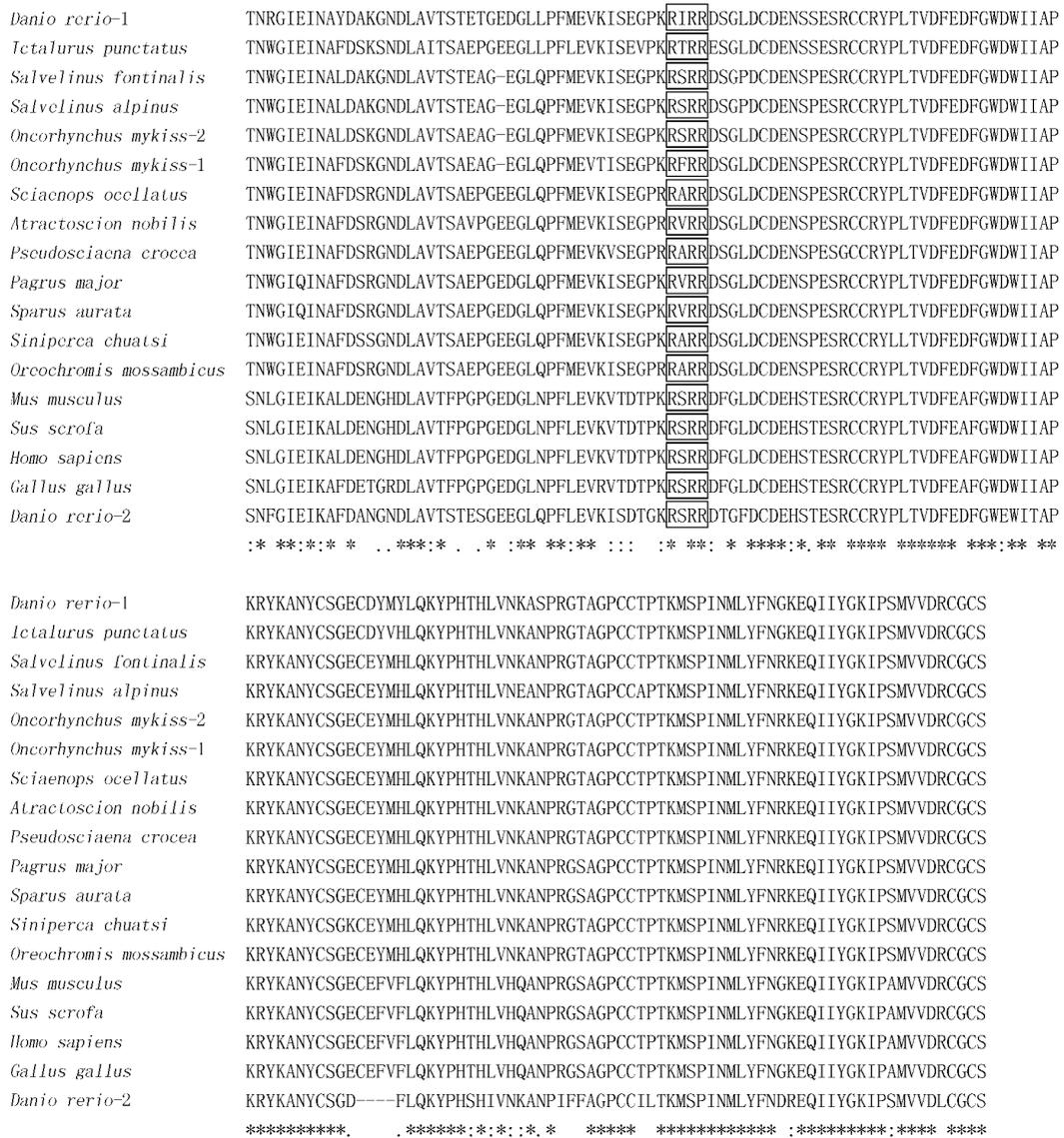


图 4 脊椎动物 MSTN 氨基酸序列比对

Fig. 4 Alignment of amino acid sequences of vertebrate myostatin

“-”表示此位置缺失氨基酸；“*”表示保守的氨基酸；RXXR 蛋白酶酶切位点用方框标出。

Dash (-) means absence of amino acid; * indicates conserved amino acid; RXXR proteolytic cleavage site was square framed.

Danio rerio-1: 斑马鱼-1 (AAQ11222.1); *Ictalurus punctatus*: 斑点叉尾鲷 (AAK84666.1); *Salvelinus fontinalis*: 溪红点鲑 (AAK08152.2); *Salvelinus alpinus*: 美洲红点鲑 (CAH25443.1); *Oncorhynchus mykiss-2*: 虹鳟-2 (NP_001117755.1); *Oncorhynchus mykiss-1*: 虹鳟-1 (AAK71707.1); *Sciaenops ocellatus*: 眼斑拟石首鱼 (ABH85412.1); *Atractoscion nobilis*: 锤形石首鱼 (AAX73250.1); *Pseudosciaena crocea*: 大黄鱼 (AAW34055.1); *Pagrus major*: 真鲷 (AAX82170.1); *Sparus aurata*: 金头鲷 (AAK53544.1); *Oreochromis mossambicus*: 莫桑比克罗非鱼 (AAK28706.1); *Mus musculus*: 小家鼠 (NP_034964.1); *Sus scrofa*: 猪 (ABO64642.1); *Homo sapiens*: 人 (ABI48419.1); *Gallus gallus*: 鸡 (NP_001001461.1); *Danio rerio-2*: 斑马鱼-2 (NP_001018627.1)。

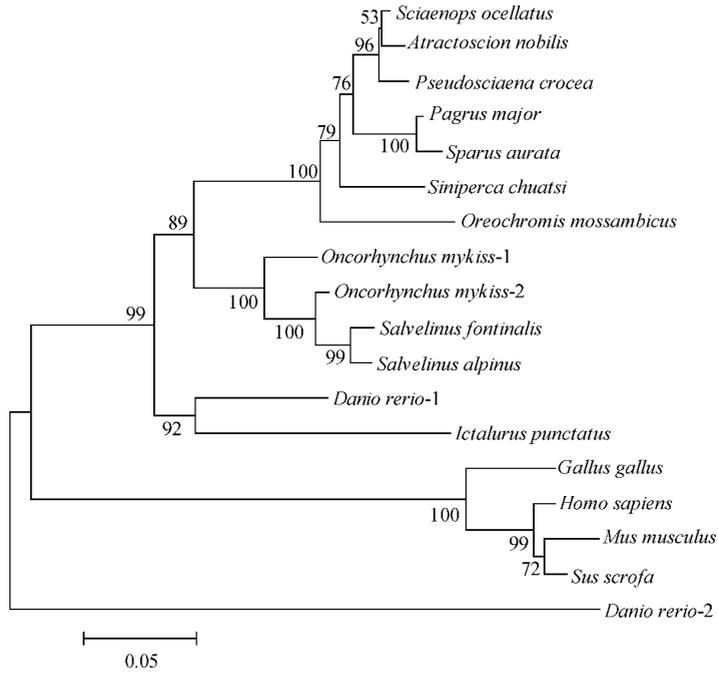


图 5 脊椎动物肌肉生长抑制素的 NJ 系统关系树

Fig. 5 The NJ phylogenetic tree of vertebrate myostatin

分支节点的数值表示自引导值 (bootstrap) ,重复 1 000 次。

Nodal values represent percentage values of 1 000 bootstrapping.

Sciaenops ocellatus: 美国红鱼 (ABH85412. 1); *Atractoscion nobilis*: 锤形石首鱼 (AAX73250. 1); *Pseudosciaena crocea*: 大黄鱼 (AAW34055. 1); *Pagrus major*: 真鲷 (AAX82170. 1); *Sparus aurata*: 金头鲷 (AAK53544. 1); *Oreochromis mossambicus*: 莫桑比克罗非鱼 (AAK28706. 1); *Oncorhynchus mykiss-1*: 虹鳞-1 (AAK71707. 1); *Oncorhynchus mykiss-2*: 虹鳞-2 (NP_001117755. 1); *Salvelinus fontinalis*: 溪红点鲑 (AAK08152. 2); *Salvelinus alpinus*: 美洲红点鲑 (CAH25443. 1); *Danio rerio-1*: 斑马鱼-1 (AAQ11222. 1); *Ictalurus punctatus*: 斑点叉尾鲷 (AAK84666. 1); *Gallus gallus*: 鸡 (NP_001001461. 1); *Homo sapiens*: 人 (ABI48419. 1); *Mus musculus*: 小鼠 (NP_034964. 1); *Sus scrofa*: 猪 (ABO64642. 1); *Danio rerio-2*: 斑马鱼-2 (NP_001018627. 1)。

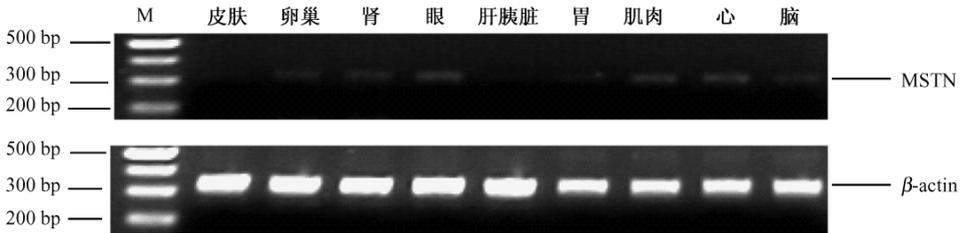


图 6 鳊肌肉生长抑制素组织表达 RT-PCR 分析

Fig. 6 RT-PCR analysis of myostatin gene expression in various tissues from *Siniperca chuatsi*

M:100 bp 分子量标记。M: 100 bp molecular marker.

长度为 318 bp; 3' RACE 扩增利用了引物 M13 primer M4, RNA 经反转录后, 用引物 F2 和 M13 primer M4 进行扩增, 电泳检测没有得到预期大小的片段, 接着用该产物为模板, 以引物 F3 和 M13 primer M4 做半巢氏扩增, 获得 1 600 bp 左右大小的片段 (图 2); 5' RACE 扩增用引物 R2 和 UPM 扩增获得一条特异带, 大小在 1 300 bp 左右 (图 2)。

3' RACE 和 5' RACE 产物分别经纯化、克隆、测序后拼接, 获得了鳊肌肉生长抑制素基因 cDNA 序列 (图 3)。该基因 cDNA 全长 2 627 bp, 包括 117 bp 的 5' 端非翻译区, 1 376 bp 的 3' 端非翻译区和 1 134 bp 的阅读框, 共编码 377 个氨基酸残基。3' UTR 区含有典型的加尾信号序列 ATTTAA 和 PolyA 尾。

信号肽预测结果显示, 在鳊 MSTN 氨基酸序列的第 22 和 23 氨基酸残基之间存在一个信号肽切割位点, 推测前 22 个氨基酸残基为信号肽序列。鳊 MSTN 包含两段保守区域: TGF- β 前肽区域 (41 ~ 256) 和 TGF- β 功能域 (282 ~ 376)。鳊 MSTN 也具有典型的 RXXR 蛋白酶水解位点, 位于 265 ~ 268 的 RARR; 共有 13 个保守的半胱氨酸残基位点 (42, 45, 140, 141, 274, 283, 284, 311, 315, 341, 342, 374, 376), 其中在 C 端区域内的 9 个半胱氨酸残基在所有脊椎动物 MSTN 中都存在, 其中 8 个位于 TGF- β 功能域内 (图 3)。

鳊与其他脊椎动物的 MSTN 氨基酸序列有着非常高的相似性 (62% ~ 94%), 特别是 C 端生物活性区, 氨基酸数目都一致 (图 4)。其中, 与加州鲈 (ABG57073.1)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*, AAW47740.1)、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*, ABS19667.1)、条纹石鲈 (AAK67983.1)、眼斑拟石首鱼 (ABH85412.1)、欧洲狼鲈 (*Dicentrarchus labrax*, AAW29442.1)、白鲈 (AAK67984.1)、尼罗尖吻鲈 (*L. niloticus*, ABS19668.1)、波纹短须石首鱼 (AAL26885.1)、大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*, AAW34054.1)、锤形石首鱼 (*Atractoscion nobilis*, AAX73250.1)、牙鲆^[14]等鱼类的相似性高达 90% ~ 94%。

基于 MSTN 氨基酸序列构建了脊椎动物 MSTN 亲缘关系树 (图 5)。鳊与其他鱼类单独聚为一支, 鱼类、鸟类与哺乳类的系统关系与其传统分类地位一致。

2.2 肌肉生长抑制素 mRNA 在成体各组织中表达 以 F4 和 R4 为引物, RT-PCR 检测发现鳊肌肉生长抑制素在各组织中均扩增出一条约 300 bp 左右的特异片段。其中, 卵巢、肾、眼、肌肉、心、脑、皮肤和胃中均有表达, 肝胰脏未见表达 (图 6)。

3 讨论

本实验应用 RACE 法首次克隆获得了鳊全长 2 627 bp 的 MSTN cDNA 序列, 共编码 377 个氨基酸。结构分析显示该序列中含有 N 端信号肽、RARR 蛋白酶切位点和 13 个保守半胱氨酸残基等, 这些与其他脊椎动物 MSTN 特征基本相同^[19]。Blast 结果与系统发育分析显示该序列在脊椎动物中与鱼类 MSTN 序列的相似度最高。

对鱼类 MSTN 基因克隆研究发现, 一些鲑、鳟鱼类具有两个 MSTN 异构体, 异构体出现一般被认为是由于基因重复发生的结果^[6-7]。斑马鱼也有两个不同的 MSTN, 其 MSTN1 和 MSTN2 的差异较大, 在斑马鱼中 MSTN 基因重复的发生可能较早, 造成两个基因在进化上产生较大差异^[20]。本实验中获得了鳊一个特异的 MSTN 基因, 是否存在第二个 MSTN 基因有待进一步探索。

鳊 MSTN 氨基酸序列的第 22 和 23 氨基酸残基之间存在一个信号肽切割位点。与其他 TGF- β 家族成员蛋白一样, MSTN 以前体形式合成后被蛋白酶酶切, 形成 N 端前肽和 C 端活性成熟肽, 酶切之后, 前肽与成熟肽仍以非共价结合的方式结合^[21]。研究表明, MSTN 前肽不仅对 MSTN 成熟肽二聚体的正确形成极其重要, 还可通过与成熟肽结合, 抑制 MSTN 与其受体结合, 阻断其功能^[22]。鱼类 MSTN 基因的组织表达与哺乳类存在明显差异。哺乳动物的 MSTN 主要在骨骼肌中强烈表达, 而鱼类 MSTN

表达范围比较广泛,不仅局限于骨骼肌,还在眼、鳃、脑、肾、肠和性腺等组织中表达^[5],在鱼类一些组织中还检测到 MSTN 前体^[23]。本实验中,我们发现鳊 MSTN 在卵巢、肾、眼、胃、肌肉、心、脑和皮肤中均有不同程度表达,而肝脏中未见表达。鱼类为低等脊椎动物,MSTN 基因的组织表达分布广泛性,表明 MSTN 除参与肌肉发育生长调控外,还可能参与神经系统发生、免疫功能调控等作用^[24-25]。

参 考 文 献

- [1] McPherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*, 1997, 387: 83 - 90.
- [2] Thomas M, Langley B, Berry C, et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem*, 2000, 275: 40235 - 40243.
- [3] Kambadur R, Sharma M, Smith T P, et al. Mutations in *myostatin (GDF8)* in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res*, 1997, 7: 910 - 916.
- [4] Mosher D S, Quignon P, Bustamante C D, et al. A mutation in the myostatin gene increase muscle mass and enhance racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet*, 2007, 3(5): 779 - 786.
- [5] Xu C, Wu G, Zohar Y, et al. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J Exp Biol*, 2003, 206: 4067 - 4079.
- [6] Rescan P Y, Juetel I, Ralliere C. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscle of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol*, 2004, 204: 3523 - 3529.
- [7] Ostbye T K, Galloway T F, Nielsen C, et al. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in variety of tissues. *Eur J Biochem*, 2001, 268(20): 5249 - 5227.
- [8] Rodgers B D, Weber G M, Sullivan C V, et al. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology*, 2001, 142: 1412 - 1418.
- [9] Rodgers B D, Weber G M. Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone americana*. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Bio*, 2001, 129: 597 - 603.
- [10] Maccatrozzo L, Bargelloni L, Radaelli G, et al. Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure, and expression pattern. *Mar Biotechnol*, 2001, 3: 224 - 230.
- [11] Kocabas A M, Kucuktas H, Dunham R A, et al. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1575: 99 - 107.
- [12] Maccatrozzo L, Bargelloni L, Patarnello P, et al. Characterization of the myostatin gene and a linked microsatellite marker in shi drum (*Umbrina cirrosa*, Sciaenidae). *Aquaculture*, 2002, 205: 49 - 60.
- [13] Ye H Q, Chen S L, Sha Z X, et al. Molecular cloning and expression analysis of the myostatin gene in sea perch (*Lateolabrax japonicus*). *Mar Biotechnol*, 2007, 9: 261 - 272.
- [14] 徐建勇,陈松林. 牙鲆肌肉生长抑制素(MSTN)基因克隆. *水产学报*, 2008, 32(4): 497 - 506.
- [15] 李兴美,范巍,张彬,等. 鲤鱼肌肉生长抑制素基因(MSTN)的克隆及其组织表达特征. *水生生物学报*, 2007, 31(5): 643 - 647.
- [16] 李胜杰,白俊杰,叶星,等. 加州鲈肌肉生长抑制素(MSTN)cDNA的克隆和序列分析. *海洋渔业*, 2007, 29(1): 13 - 19.
- [17] 薛良义,李婷,杨巧一,等. 眼斑拟石首鱼肌肉生长抑制素基因克隆及组织表达分析. *海洋学报*, 2008, 30(3): 95 - 101.
- [18] 钟其旺. 几种鲷鱼类 Myostatin 基因的克隆及结构和表达分析. 青岛:中国海洋大学博士学位论文, 2007.
- [19] 赵浩斌,彭扣,王玉凤,等. 鱼类肌肉生长抑制素研究进展. *水生生物学报*, 2006, 30(2): 227 - 231.
- [20] Biga P R, Roberts S B, Iliev D B, et al. The isolation, characterization and expression of a novel GDF 11 gene and a second myostatin form in zebrafish, *Danio rerio*. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2005, 141: 218 - 230.
- [21] Lee S J, McPherron A C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98(16): 9306 - 9311.
- [22] Hill J J, Davies M V, Pearson A A, et al. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem*, 2002, 277: 40735 - 40741.
- [23] Radaelli G, Rowlerson A, Mascarello F, et al. Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a

- comparative immunolocalization study. *Cell Tissue Res*, 2003, 311: 239 - 250.
- [24] Garikipati D K, Gahr S A, Roalson E H, et al. Characterization of rainbow trout myostatin-2 genes (rtMSTN-2a and-2b): genomic organization, differential expression, and pseudogenization. *Endocrinol*, 2007, 148 (5): 2106 - 2115.
- [25] Helterline D L, Garikipati D, Stenkamp D, et al. Embryonic and tissue-specific regulation of myostatin-1 and-2 gene expression in zebrafish. *Gene Comp Endocrinol*, 2007, 151 (1): 90 - 97.

《动物学杂志》投稿注意事项

1 稿件的投寄

稿件通过本刊的电子信箱投寄 (E-mail: journal@ioz.ac.cn; Word 文件作附件), 同时邮寄打印稿一份。打印稿小四号字单面 1.5 倍行距打印。作者在投稿的同时务必出具公函或作出承诺, 稿件不能一稿多投和侵权。

2 论文的格式要求

题目 应言简意赅。中文题目字数一般不超过 20 个字; 英文题目不超过 10 个实词, 实词首字母大写。

作者 署名入应是对论文的全部或部分内容做出主要贡献, 并能对文章内容负责的人。

单位 应写作者单位的标准全称及所在地和邮编。

摘要 中文摘要放在文首。内容包括: 研究目的、方法、结果 (主要数据) 和结论。用第三人称叙述。英文摘要放在中文摘要下面, 其内容应与中文摘要相对应或略详于中文摘要。

关键词 一般为 3 ~ 5 个, 中英文对应, 分别列在中英文摘要下面。

前言 结合文摘阐述国内外相关研究领域的发展状况及本研究的目的和意义。

正文 材料与方法对材料的来源及方法的出处应详细陈述; 结果的数据要完整, 微观形态的稿件应有实验照片作为依据; 文字叙述要简洁明了, 与图表内容相互呼应; 讨论应依据前言的内容、结果的数据、现象展开讨论, 以达到解决问题或得出结论的目的。

全文书写规格 文中请使用国家颁布的法定计量单位和符号及规范化的名词、术语。文中首次出现的英文缩写词, 应先写出中文名称后, 再在括号内写出英文全称和缩写词。物种名称在文中第一次出现时应附拉丁学名 (种属名用斜体, 属名首字母大写)。名词术语的用法文中应前后一致。

① **小标题**: 应简短准确、层次清楚。各级标题一律采用阿拉伯数字连续编码, 左顶格编排, 如“1” (一级标)、“1.1” (二级标)、“1.1.1” (三级标)。

② **图表**: 力求精选, 反应同一数据的图与表不能重复。其序号一律采用阿拉伯数字编码, 在文中引用处注明。线条图应用计算机绘制; 照片图要求反差适中、层次清晰。显微及电镜照片, 应注明长度标尺和放大倍数。

参考文献 应列出与本文直接有关的中外文主要文献。本刊文献的著录格式采用顺序编码制, 即以文献在文中出现的先后顺序连续编码, 加方括号标注在文中引用处, 文后文献表的文献要与文中一致, 并按文中的顺序排列, 多名作者在列出前三名作者后加“等”或“et al”。具体格式要求为:

① **期刊**: 作者. 题名. 刊名. 出版年. 卷(期)号: 起止页码. 示例:

[1] 郑光美. 黄腹角雉. *动物学杂志*, 1987, 22(5): 40 - 43.

[2] Wu P, Zhou K Y. General condition of systematics study on Tesudines. *Chinese Journal of Zoology*, 1998, 33(6): 38 - 45.

② **专著**: 作者. 书名. 版本 (第一版不标注). 出版地: 出版者, 出版年, 起止页码. 示例:

[3] 孙儒泳. *动物生态学原理* (2 版). 北京: 北京师范大学出版社, 1992, 329 - 330.

[4] Jiang Z G. *Conservation Biology*. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1997, 160 - 164.

③ **论文集**: 作者. 题名 // 编者. 论文集名. 出版地: 出版者, 出版年, 起止页码. 示例:

[5] 陈大元. 动物显微受精与克隆研究 // 中国动物学会. *中国动物科学研究*. 北京: 中国林业出版社, 1999, 59 - 64.

[6] Yang T. On the leeches from Wuling Mountains area in south China // Song D X. *Invertebrates of Wuling Mountains Area, Southwestern China*. Beijing: Science Press, 1997, 395 - 399.