

张颖,李冰,朱健,等. 异育银鲫中科 3 号 *MSTN* 基因的克隆与序列分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):40-44.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.011

异育银鲫中科 3 号 *MSTN* 基因的克隆与序列分析

张颖^{1,2}, 李冰², 朱健^{1,2}, 蒋高中^{1,2}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏无锡 214081)

摘要:采用同源克隆和末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)方法分离克隆了异育银鲫(*Allogygogenetics crucian carp*)中科 3 号肌肉生长抑制素(myostatin, *MSTN*)基因全长 DNA, 得到 3 394 bp 全长的 DNA, 包含 3 段外显子和 2 段内含子, 其中 2 098 bp 的全长 cDNA 在 NCBI 数据库中进行序列比对后, 确定为异育银鲫中科 3 号 *MSTN* 基因。对推测的 *MSTN* 基因氨基酸序列进行同源性比对和系统分析显示: *MSTN* 基因在异育银鲫与斑马鱼及其他鱼类间的氨基酸序列相似度为 73.5% ~ 98.0%, 与鲤鱼 *MSTN* 基因相似度最高(98.0%), 不同物种间 *MSTN* 的氨基酸序列较为保守。用半定量 RT-PCR 检测 *MSTN* 基因在异育银鲫心、肠、肌、脑、鳃和肝的相对表达量结果表明, *MSTN* 基因在脑中含量最高, 其次是肌、鳃、心、肠, 在肝脏中含量最低。

关键词:异育银鲫; 肌肉生长抑制素; 同源法克隆; 末端快速扩增法; 序列分析; 组织表达分析

中图分类号: S917.4; Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0040-05

鲫鱼是我国重要的淡水经济养殖鱼类, 异育银鲫(*Allogygogenetics crucian carp*)中科 3 号是当前主要的鲫鱼养殖品种之一。该品种是中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室桂建芳研究员等技术人员利用银鲫的双重生殖方式, 从高体型(D 系)异育银鲫(♀)与平背型(A 系)异育银鲫(♂)交配所产后代中选育出来, 再经异精雌核培育而来的异育银鲫第 3 代新品种^[1]。中科 3 号异育银鲫具有生长速度快、遗传性状稳定等优点^[2-4], 作为经济鱼类, 其肌肉的生长发育是重要的生长过程, 受分子水平调控等多因素的影响^[5]。

肌肉生长抑制素(myostatin, *MSTN*)又称生长分化因子-8(growth differentiation factor-8, GDF-8), 属于转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族, 是肌肉

发育和生长的负调控因子^[6]。该基因是 McPherron 等于 1997 年在小鼠骨骼肌的 cDNA 文库中发现的, 试验表明, *MSTN* 基因敲除后的小鼠会发生肌细胞的增生与肥大, 从而导致骨骼肌大量增加的现象^[6]; 牛中 *MSTN* 基因的自然缺失与突变也已被发现, 突变结果导致 *MSTN* 基因失活, 肌肉增生^[7-8]。

目前, 已有不少关于 *MSTN* 基因克隆及作用机制的研究, 包括哺乳类^[9-11]、鸟类^[12-14]动物, 在鱼类的研究中, 也有不少物种的 *MSTN* 基因被报道, 包括斑马鱼(*Danio rerio*)^[8,15]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[16]、大麻哈鱼(*Salmo salar*)^[17]、莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[18]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[19]、石首鱼(*Umbrina cirrosa*)^[20]、奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)^[21]、鳊鱼(*Elopichthys bambusa*)^[22]、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[23]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[24]、勒氏笛鲷(*Lutjanus russellii*)^[25]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[26]、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)^[27]、真鲷(*Chrysophrys major*)^[28]、鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)^[29]等。鱼类 *MSTN* 基因除在骨骼肌中表达外, 还可在其他组织如脑、心脏、肾、肠、精巢、鳃、脾、眼、肝等中表达^[22,30], 不同于哺乳动物和鸟类的表达谱^[31-32]。试验表明, *MSTN* 基因功能缺失可以导致斑马鱼肌肉数量和体积的增加^[15]。*MSTN* 通过内分泌、自分泌和旁分泌 3 种不同的作用途径发

收稿日期: 2013-12-13

资助项目: 国家科技支撑计划(编号: 2012BAD25B07); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金(编号: 2013JBFC08)。

作者简介: 张颖(1988—), 女, 江苏南通人, 硕士研究生, 研究方向为水产动物遗传育种及养殖生物学。E-mail: 867451280@qq.com。

通信作者: 蒋高中, 博士, 研究员, 主要从事渔业文化与科技发展、渔业科技史等研究。Tel: (0510)85550702; E-mail: jianggz@ffrc.cn。

[13] 张义正, 刘白玲, 何先祺. 影响枯草杆菌原生质体转化的因素[J]. 微生物学通报, 1997, 24(4): 210-213.

[14] Waschkau B, Waldeck J, Wieland S, et al. Generation of readily transformable *Bacillus licheniformis* mutants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(1): 181-188.

[15] Chang S, Cohen S N. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA[J]. Molecular & General Genetics, 1979, 168(1): 111-115.

[16] 唐雪明, 邵蔚蓝, 王正祥, 等. 地衣芽孢杆菌感受态细胞的形成及高效电转化[J]. 生物技术, 2002, 12(4): 13-15.

[17] Lu Y P, Zhang C, Lv F X, et al. Study on the electro-transformation conditions of improving transformation efficiency for *Bacillus subtilis*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(1): 9-14.

tion conditions of improving transformation efficiency for *Bacillus subtilis*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(1): 9-14.

[18] Yang M M, Zhang W W, Bai X T, et al. Electroporation is a feasible method to introduce circularized or linearized DNA into *B. subtilis* chromosome[J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(5): 2207-2213.

[19] 韩璞, 田洪涛, 苑社强, 等. 罗伊氏乳杆菌原生质体的制备与再生条件的研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(1): 10-18.

[20] Boizet B, Flickinger J L, Chassy B M. Transfection of *Lactobacillus bulgaricus* protoplasts by bacteriophage DNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(12): 3014-3018.

挥作用,可与成肌细胞膜上的受体结合而引起受体自身的磷酸化,启动一系列信号传导过程,最终抑制成肌细胞的增殖和分化^[33]。*MSTN* 作为肌肉生长发育相关的重要调控基因,其相关研究对了解鱼类肌肉生长机理有重要作用。本试验克隆了异育银鲫 *MSTN* 基因,并对其序列和组织表达进行了分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用异育银鲫中科 3 号质量约 80 g,购自扬州市江都区,取 20 尾于中国水产科学研究院淡水渔业研究中心(江苏无锡)的育种实验室进行暂养,用于 RNA 及 DNA 的提取。基因提取、反转录等试剂盒均购自 TaKaRa 公司(大连)。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA、基因组 DNA 的提取和 cDNA 模板的制备

取试验鱼骨骼肌、脑、肝等 6 个组织,按 RNAiso plus 试剂盒的方法提取总 RNA,使用基因组 DNA 提取试剂盒从全血中提取基因组 DNA,用 1% 琼脂糖电泳和分光光度计检测所提基因的质量和浓度。按反转录试剂盒要求进行反转录,反应后置于 -20 ℃ 保存。

1.2.2 *MSTN* 基因克隆与序列分析 根据鲤鱼 (*Cyprinus carpio*, GQ214770.1) 和斑马鱼 (*Danio rerio*, AY323521.1) 的 *MSTN* 基因设计 3 对引物 MSTNF1、MSTNR1、MSTNF2、MSTNR2、MSTNF3、MSTNR3 (表 1),用于扩增 *MSTN* cDNA 核心片段。根据所得序列设计用于 5'RACE 和 3'RACE 的特异性引物: MSTN5outer、MSTN5inner、MSTN3outer、MSTN3inner (表 1),分别按照 5' RACE 和 3' RACE 试剂盒进行 2 轮扩增的巢式 PCR。由鲤鱼 (*Cyprinus carpio*, GQ214770.1) *MSTN* 基因全序列设计 2 对引物 MSTNF4、MSTNR4、MSTNF5、MSTNR5 (表 1) 扩增 2 个内含子。扩增产物均在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳检测,胶回收后经连接、转化、扩大培养、酶切验证后,将阳性克隆送至上海铂尚生物技术有限公司测序。将所测序列登录 NCBI 进行 BLAST 分析;用 DNASTar 软件分析序列及开放阅读框,并对其分子量、等电点、氨基酸组成等进行分析;用 MEGA5.0 软件中的距离矩阵邻接法 (neighbor-joining) 构建系统进化树。

1.2.3 半定量 RT-PCR 检测 取试验鱼骨骼肌、脑、肝、肠、心、鳃 6 个组织,提取总 RNA,平衡起始浓度后,反转录成 cDNA。根据拼接获得的 *MSTN* 全长 cDNA 序列,设计半定量 RT-PCR 引物 MSTNF6、MSTNR6 (表 1) 和内参 β -actin (GenBank: AB039726.2) 基因引物 β F、 β R^[34] (表 1),以各组织的反转录产物为模板,用以上 2 对引物进行扩增。产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测并拍照。

2 结果与分析

2.1 试验结果

将 PCR 产物测序后进行比对,得到了异育银鲫 *MSTN* 基因的完整 DNA 序列,包括 416、360、454 bp 3 段部分编码序列,5' 和 3' 两端 324、990 bp 序列,以及 756、776 bp 2 段内含子序列。经 NCBI 的 BLAST 序列比对,确认所得序列为鲫鱼的 *MSTN* 序列。

表 1 异育银鲫中科 3 号 *MSTN* 基因克隆和组织表达所用引物

引物	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)
MSTNF1	ATTAATTGCATGCGGTTCAGTGG	56.0
MSTNR1	GGTTCGCTTGGATCTTCGGAC	59.5
MSTNF2	CCATCGTCAAGTAGATCGGAAACC	59.6
MSTNR2	GACTCTGATGAATTCTCGTCGCAGT	59.6
MSTNF3	CATGGAGGTGAAAATCTCGGAGG	59.6
MSTNR3	CAGCGGTCTACTACCATTGAGGG	61.3
MSTN5outer	CCATCCTTACTGTCATCCCCC	59.5
MSTN5inner	GAGTCGGAGTTTGCTAAGAATC	55.8
MSTN3outer	CCACACCCATCTGCTGAACAAG	59.5
MSTN3inner	TTTACTTCAACGGCAAGAGCAGA	56.2
MSTNF4	GATGAACATGCCACCACAGAGAC	59.6
MSTNR4	GGTTTCCGATCTACTTGAACGATG	57.9
MSTNF5	ACCAACTGGGGCATTGAGATAAAC	57.9
MSTNR5	ATCGCAGTCCAGCCAGAGCT	61.5
MSTNF6	AGGTGCATGTAGTCGCATTCTCC	59.6
MSTNR6	GGCTGGGACTGGATTATTGCTC	59.5
β F	TTGAGCAGGAGATGGGAACCG	59.5
β R	AGAGCCTCAGGGCAACGGAAA	59.5

注:引物均由上海铂尚生物技术有限公司合成。

2.2 结果分析

2.2.1 *MSTN* 基因序列、氨基酸组成及特征位点分析 以异育银鲫骨骼肌 cDNA 为模板,经 PCR 扩增、胶回收、克隆和测序,去除载体序列和重叠序列,拼接得到 2 098 bp 的全长 cDNA,其中 5'端扩增得到 268 bp,5'UTR 为 89 bp;3'端扩增得到 934 bp,3'UTR 为 881 bp,详见图 1,可以看出,该 cDNA 包括典型的转录终止信号序列 (AATAAA) 和 polyA 尾。用 DNASTAR 软件预测可知,*MSTN* 的分子量约为 42.25 ku,开放阅读框为 1 128 bp,编码 375 个氨基酸,其中包含强碱性氨基酸 (K、R) 43 个,强酸性氨基酸 (D、E) 47 个,疏水性氨基酸 (A、I、L、F、W、V) 116 个,极性氨基酸 (N、C、Q、S、T、Y) 105 个,等电点为 6.55。BLASTP 分析发现,异育银鲫 *MSTN* 蛋白有 2 个典型的 TGF- β 蛋白结构域 (图 1),1 个是 TGF- β 前肽结构域,从第 37 位到第 256 位,共 220 个氨基酸残基;另 1 个是 TGF- β 功能域,是 TGF- β 家族基因的活性区域,从第 281 位到第 375 位,共 94 个氨基酸残基。信号肽预测结果显示,N 末端含有 1 个 22 个氨基酸组成的信号肽序列,切割位点位于 22 位的 G 和 23 位的 D 之间;碳端生物活性区含有 9 个保守的半胱氨酸残基;异育银鲫 *MSTN* 蛋白也有典型的 RXXR 蛋白酶水解位点,为 RARR (第 263-266 位);起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA (图 1)。总体看出,异育银鲫与其他物种的 *MSTN* 基因特征相同^[22-24]。

2.2.2 异育银鲫 *MSTN* 序列同源性与系统发育分析 将异育银鲫 *MSTN* 与其他动物 *MSTN* 的 ORF 序列进行同源性比较,结果见表 2。

用 DNAMAN Version 6.0 软件,比较异育银鲫与人、小鼠、原鸡、斑点叉尾鲷、斑马鱼、大马哈鱼、大西洋鲑、虹鳟、鲢鱼、鲤和牙鲆的 *MSTN* 氨基酸同源性。结果显示,异育银鲫与上述物种的序列同源性分别为 75.0%、73.5%、75.0%、88.1%、89.9%、91.3%、75.4%、76.9%、97.0%、98.0%、79.8%,异育银鲫 *MSTN* 与鲤鱼 *MSTN* 的遗传距离最小,仅为 0.020。

gaaaaatctacttgtccgggtgctgtgaggttcatttgcatacgaaatcagatcaaacatcg
caagcatccttttagcacgcttttgaacATGCAATTTTACACAGGCTTTAATTTCTCTAAGT
M H F T Q V L I S L S
GTATTAATTGCATATGGTTCAGTGGGTCATGGAGATATAACGGCGCACCAGACGCTTCC
V L I A Y G S V G H G D I T A H Q Q P S
ACAGCCACGGAGAAAGCGAGCATGCTCCACATGTGAGTTGACAGAACACAGCAAGCTG
T A T E E S E Q C S T C E F R Q H S K L
ATGAGATCGATGCCATCAAGTCCAGATTCTTAGCAAACTCCGACTCAAAACAGGCTCCA
M R L H A I K S Q I L S K L R L K Q A P
AACATCAGCGGGACGTGGTCAAGCAGCTTTTACCAAAAGCAGCGCTTGGCAACAATA
N I S R D V V K Q L L P K A P P L L Q Q L
CTGGATCAGTACGATGTTCTGGGGGATGACAGTAAGGATGGAGCTATGGAAGAGGATGAT
L D Q Y D V L G D D S K D G A M E E D D
GAACATGCCACACAGAGACCATCATGACCATGGCCACAGAGCGtaagatcatatattt
E H A T T E T I M T M A T E
taaaagttaattcaagtagatgtatcttttaacaatggacaaaacatagggtatattt
ggagagacccctttacggctattgtgcattaaatgcacagtttaatgctaaaaaataatcgt
cttactgatttttttaagcctttggttgtctctttatcagccttctgtaaccgatttta
cgcacgctgaacttggaaagcgacgaagcgaccacagagctggctcagagggaaaatgtttt
cacttttaccacacgtgacatttacaacactgtagttaacacttggtttatatctcaggcact
tttttttaggtgaaaatgcgtattatcatatatacatataaagttaagttaacactcact
agttttttaaattgataaaatgtttccctccgcaatgaacgttttaaggttttttttatataaa
ataactatatacttaaacatatatgtatgtatcaatcaattttttacatagaactgtctg
ctatttctgtcttaagtgtattgtatttttgggtgtagtcacagttatttcttttaaaacgt
aatcttttcagtttatatcagtgcccaatcatggaacgcttttaataataaaactgtcact
tgaataaacagcagatatataaacatatataacagctccaataatcgtttgttctcttttttc
agCTGACCCCATGCTTCAAGTAGATGCGAAACCGAAGTGTGTTTCTCTCTCTGCTCC
P D P I V Q T V D R K P K T C C F S F S P
GAAGATCCAAGCGAACCGGATCGTAAGAGCGCAGCTCTGGTTCATCTGAGACCGCGGGA
K I Q A N R I V R A Q L W V H L R P A E
AGAAACGACCCATGTTTCTTACAGATATACCGCTGTAGTGCCTGACCGGACGAGGAAG
E T T T V F L Q I S R L M P V T D G G R
GCACATACCAATACGATCCCTGAAGATGACGCTGAACGAGCAGTACGCTTTGGCAGAG
H I R I R S L K I D V N A A V T S W Q S
TATAGACGCTCAAAACAGGTGCTCAGCGTGTGGTTAAGCAACCGGAGCAACCTGGGGCAT
I D V K Q V L T V W L R Q P E T N W G I
TGAGATAAACCGGTATGACGCGCAAGGAAACGACTTGGCGTCACTCTAGCTGAGCCTGG
E I N A Y D A K G N D L A V T S A E P I
AGAAGATGGACTGtgtagtcagctgttaatggttaccaagataatgttttgtaaaatat
E D G L
aaccatttttagacagagacttttgcacagtaattattgtcgaatggcactaatgagaaat
tatataagattgttttagttctcaataactttgttttaataaaatgatatatttttagtgaag
tatatgtcttttttagtaattaaatgacttgccttgcactgtctcaacgaacaaaataaatt
aacctctgtgaaacttaaatcactttacatttaaaactacatttaagtcgtacttttaca
aaaaagattgtatttaatttttatttaataataaagtcaataaaaaatgtgttgcanaa
aaaaagttttacattttattgttcataattgtgttctgtgatacagaatgcttcata
tttctggggcgtgtaactgcaattagaattgaaatattcctttaaaggcaccattaaagca
atgataacttaataagtggaattggaacagaatcaatagatcaatttaattgttgagca
agctactttatgttcagacaggagttggcaagcggaagcaccacagataaactgaaag
actggtcttttggttttctctcactccagCTCCCTTCATGGAGGTGAAAACTTCGGAG
L P F M K L S E
GGCCCAAGCGAATCCGGAGGACTCTGGGCTGGACTGGATGAGAAATGCTCGGAGTCT
G C K R I R R D S G L D C D E N S S E
CGATGCTGACAGTACCTCTCACTGTGGACTTCGAGACTTCGGCTGGGACTGGATTATT
R C C R V P L T V D F E D F G W D W I I
GCTCCGAAGCGCTATAAGGCGAATTACTGTTGGGAGAAATGCGCATACATGACCTCGAG
A P K R Y K A N Y C S G E C D Y M H L Q
AAATATCCCAACCCATCTGGTGAACAAGGCGAATCCACGAGGACCGCGCGCCCTGC
K Y P H T H L V N K A N P R G C T A G P C
TGCAACCCCAAGGTTGCTCCCATCAACATGCTTTACTTCAACGGCAAAAGAGCAGATC
C T P T K V S P I N M L Y F N G K E Q I
ATCTACGGCAAGATCCCTCAATGGTAGTACCGCTGTGGCTGCTCTGaccagtgcc
I Y G K I P S M V D R C G C S *
caggcaggacttgatcgcttcacagaccggacatctgatacaacattccaccatccat
tatcagtgctttccgcaagacactgtgcaattagaaggacgtcactcactctctgtggcac
ctgcttattgactatgttttttgcattttctcttaaatcagttatctctgccacaggag
tccaactgtacgtggaatgatacgaaggaactgataactggtggaacttgggaatggac
acttttgaatggacgacattctctgcttttattcatgtttttcactttgtcagaatactc
tcattaggatacacatgtattatgcagccactccaaaatacacgtcatttaggttttgc
gtaacagctgagcttgttttaagaagagtatacgaagaaacagagaggagacttgaaca
ctgaacagacttgaatacagtttatctgaacgaacttccacatacactgcaataaacac
accgatacaatttgtaattgtagcttttgcctactactctgtaacacagccctacac
cttgaagtattatgagatcgacatttagggcgaggaagacttgaagcaaaaggcactgt
gaaggcggtccacacatcgaaatgtgttcgagacagagactcggaaactgtaagaatgaa
tgttaatactgcacccaacactgttcttcaaacacacagatttgcactatgtgcagaccaa
tagaagaagtgtgtgctaaaatgttttgaanaactgattttgatataattgtcattgt
attgtatacttgccattgtttccatataacagttgctcttttttaaccaggttagtacatg
tatatgaacagaaatagcaaaaaaaa

表 2 异育银鲫中科 3 号与其他动物 <i>MSTN</i> 基因 ORF 的比较			
常用名	碱基同源性 (%)	氨基酸同 源性(%)	编码氨基酸 的长度(个)
鲤(<i>Cyprinus carpio</i>)	97.5	98.0	375
斑马鱼	93.8	89.9	374
鲢鱼(<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	96.5	97.0	375
斑点叉尾鲷	78.8	88.1	389
大马哈鱼(<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	81.1	91.3	325
虹鳟	71.8	76.9	363
大西洋鲑(<i>Salmo salar</i>)	76.3	75.4	373
牙鲆	76.9	79.8	377
原鸡(<i>Gallus gallus</i>)	64.4	75.0	375
小鼠(<i>Mus musculus</i>)	64.5	73.5	376
人(<i>Homo sapiens</i>)	64.8	75.0	375

基于异育银鲫 *MSTN* 氨基酸序列和公布的其他物种的相应序列,用 MEGA5.0 构建了脊椎动物 *MSTN* 的分子进化树(图 2)。结果表明,整个进化树分为 2 大分支,其中 1 支由人、哺乳类和禽类组成,另 1 支由鱼类组成;异育银鲫与鲤鱼关系最近,与鲤鱼、斑马鱼、鲢鱼、斑点叉尾鲷 4 种鲤形目鱼类在 1 个分支里。由进化树分析可知,所克隆到的 *MSTN* 基因属于 I 型,物种 *MSTN* 系统发育与物种间的亲缘关系一致。

2.2.3 异育银鲫 *MSTN* 基因组织表达分析 采用半定量 RT-PCR 方法检测了 *MSTN* 基因 mRNA 在异育银鲫鳃、心、肠、肝、脑、肌肉 6 个组织中的表达情况,图 3 显示,异育银鲫不同组织均有 1 条 70bp 大小相同的条带,条带亮度具有组织差异性,在脑中表达量最高,在肌肉和鳃中表达量次之。以 β -肌动蛋白基因为对照,进行了以上组织的 RT-PCR 检测,在所检测的组织样品中均得到 β -肌动蛋白基因的特意扩增条带,说明不同组织中 RNA 的提取和反转录过程正常,模板 cDNA 完整,推测不同组织中检测到的 *MSTN* 转录子存在的差异是各组织 *MSTN* 表达情况的自然表现。

3 讨论与结论

本研究采用分子克隆技术得到了异育银鲫中科 3 号 *MSTN* 基因的基因组 DNA 序列全长,并通过半定量 RT-PCR 方法检测了 *MSTN* 基因 mRNA 在异育银鲫鳃、心、肠、肝、脑、肌肉 6 个组织中的表达情况。*MSTN* 作为胞外信号分子,可与成肌细胞膜上的受体结合而引起受体自身的磷酸化,从而启动细胞内一系列信号传导过程,作用于生肌决定因子(Myod)靶基因的调控区,调节肌肉组成蛋白和蛋白基因的表达。*MSTN* 的生物学功能主要为抑制成肌细胞增殖和分化,其中抑制增殖是通过调控细胞周期进程来实现的,*MSTN* 通过抑制生肌决定因子(Myod、Myf5、MyoG)和 P21 的表达来可逆地抑制成肌细胞的分化。*MSTN* 的信号传导途径是 *MSTN*-ActR II B 型受体(蛋白激酶受体)-Smad 蛋白信号传导通路,并通过内分泌、自分泌和旁分泌 3 种不同的途径发挥作用^[33]。

根据 ClustalX2.0.11 软件对于异育银鲫 *MSTN* 氨基酸序列进行的同源性比较结果以及利用 MEGA5.0 软件的 NJ 方法构建的分子进化树表明,异育银鲫 *MSTN* 氨基酸序列与其他物种的相似度在 73.5%~98.0% 之间,符合鱼类的分类地位和亲缘关系,异育银鲫 *MSTN* 基因的氨基酸与鲤鱼的氨基酸相似度最高,其次是斑马鱼和鲢鱼,它们同属于鲤形目鲤

方框代表起始密码子和终止密码子;“*”表示终止密码子不能翻译氨基酸,只起终止作用;小写字母表示 5'UTR、3'UTR 及内含子 1、2;阴影表示 C 端活性区的保守半胱氨酸;下划线表示信号序列;双下划线表示功能结构域;删除线表示 RXXR 蛋白酶水解位点;虚下划线表示前肽结构域。各种氨基酸简称分别为:甘氨酸:G;丝氨酸:S;丙氨酸:A;苏氨酸:T;缬氨酸:V;异亮氨酸:I;亮氨酸:L;酪氨酸:Y;苯丙氨酸:F;组氨酸:H;脯氨酸:P;天冬氨酸:D;甲硫氨酸:M;谷氨酸:E;色氨酸:W;赖氨酸:K;半胱氨酸:C;精氨酸:R;天冬酰胺:N;谷氨酰胺:Q。

图 1 异育银鲫 *MSTN* cDNA 全长序列及由此推测的氨基酸序列

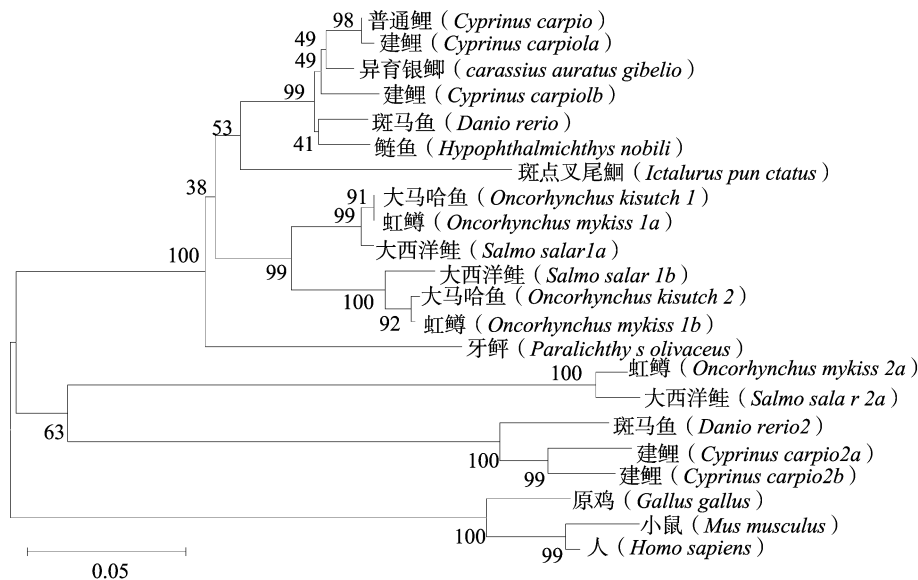


图2 异育银鲫MSTN基因和其他脊椎动物的 Neighbor-Joining 分子进化树

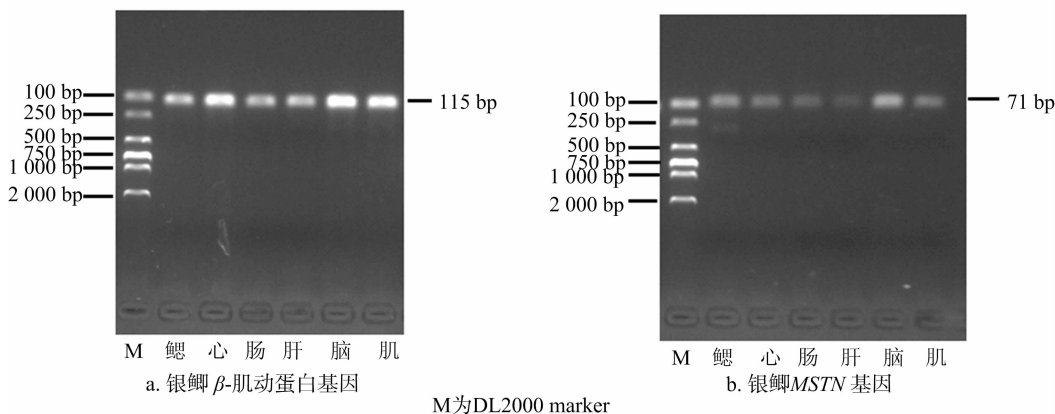


图3 银鲫 MSTN 基因表达的半定量PR-PCR 检测结果

科,亲缘关系最近;大马哈鱼、虹鳟和大西洋鲑隶属于鲑形目,因此与异育银鲫的亲缘关系较远;原鸡属于鸟类,小鼠和人属于哺乳纲,因此亲缘关系最远。研究发现 MSTN 基因在鱼类中存在 2 个异构体;在斑马鱼、大西洋鲑、大马哈鱼、虹鳟和鲤鱼中都发现了 2 种 MSTN,根据与其他物种的 MSTN 基因序列及氨基酸序列比较分析,本研究得到的异育银鲫 MSTN 基因与其他物种的 MSTN-1 同源性较高,推测所克隆的为异育银鲫 MSTN-1 基因,是否存在 MSTN-2 则需进一步探究。

采用半定量 RT-PCR 技术对异育银鲫鳃、心、肝、肠、脑、肌 6 个组织中 MSTN 的表达量进行检测,结果在上述 6 个组织均有表达,根据条带的明暗程度推断,MSTN 在上述组织中的表达水平依次为脑>肌≈鳃>心>肠>肝,与其他物种 MSTN 表达谱不同。MSTN 在哺乳动物中主要表达于骨骼肌中,小鼠 MSTN 基因只在骨骼肌中表达^[6];在猪中,MSTN 基因除了在骨骼肌中表达外,在乳腺中也有表达^[35];有研究表明,MSTN 基因还在藏系绵羊真胃、瘤胃中表达^[36]。与哺乳动物相比,MSTN 基因在鱼类中的表达更广泛,可以在脑、心、肠、鳃、肾、眼睛、脾、性腺等多个组织中表达,但在不同鱼类中表达情况也不一样。该基因在鳃的肌肉、脑和心脏中均有表达^[22];而在鲤鱼中 MSTN 仅在肌肉和脑组织中检测到,在其

他组织如心脏、精巢、眼睛和鳃中均未检测到^[37];在斑马鱼中,MSTN 的表达谱也较广,在肝、心、胃、鳃、卵巢、精巢、肾、肌肉、眼、脑中均有表达^[38];在黄河裸裂尻鱼中,MSTN 的表达在心脏、肝胰脏、肾、肌肉、脑、脂肪、肠、鳃和精巢共 9 个组织中均能检测到^[30]。由此可见,MSTN 基因的表达情况在鱼类中有较大差异,由 MSTN 在异育银鲫中的表达特征和表达水平分析可知,异育银鲫 MSTN 基因除调控肌肉生长发育外,还有可能参与心肌发育调控和代谢等其他功能。

MSTN 是肌肉生长的负调控因子,异育银鲫 MSTN 基因的克隆为进一步研究异育银鲫肌肉生长分化与调节及其他鱼类该基因的克隆提供了依据,并为进行分子育种和其他应用创造了条件,人工控制 MSTN 的活性成为养殖业的一大课题。进一步可以有以下研究方向:利用分子标记技术选育肉质性状优良的鱼类;利用基因敲除技术获得 MSTN 缺失鱼类;利用 RNAi 技术干扰 MSTN mRNA 的表达筛选 MSTN 基因的抗体,开发饲料添加剂^[38]。本试验将继续研究 2 代异育银鲫 MSTN 基因的单核苷酸多态性 (SNPs) 并进行比较。在动物育种方面,SNPs 作为一种分子标记辅助育种强有力的工具也得到了广泛的应用,研究中会将 SNPs 与 2 个品种异育银鲫体型及体质量增长进行相关性分析,以期对异育银鲫分子标记辅助育

种提供一定依据,确定有效的育种方案,并运用到生产实践中,为养殖品种的选择提供一定的依据。

参考文献:

- [1] 桂建芳. 异育银鲫养殖新品种——“中科 3 号”简介[J]. 科学养鱼, 2009(5): 21.
- [2] 高光明. 中科 3 号银鲫养殖与推广综述[J]. 养殖与饲料, 2011(9): 12–14.
- [3] 陈学年, 郭玉娟, 王忠卫, 等. 异育银鲫“中科 3 号”与丰产鲫形态特征及生长的比较研究[J]. 淡水渔业, 2011, 41(5): 83–87.
- [4] 黄庆, 陈志刚, 周卫华, 等. 异育银鲫“中科 3 号”与第一代异育银鲫生长对比试验[J]. 科学养鱼, 2013(2): 19–20.
- [5] 赵浩斌, 彭扣, 王玉凤, 等. 鱼类肌肉生长抑制素研究进展[J]. 水生生物学报, 2006, 30(2): 227–231.
- [6] Mcpherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member[J]. Nature, 1997, 387(6628): 83–90.
- [7] Grobet L, Martin L J, Poncelet D, et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle[J]. Nature Genetics, 1997, 17(1): 71–74.
- [8] Mcpherron A C, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(23): 12457–12461.
- [9] 金定恩, 张力青, 姚艳丰, 等. 猪肌生成抑制素基因去信号肽蛋白二级构预测和 B 细胞表位分析[J]. 生物技术通报, 2008(增刊 1): 264–270.
- [10] 王全喜, 红海, 芒来. 蒙古马肌生成抑制基因(MSTN)的克隆及序列分析[J]. 华北农学报, 2006, 21(5): 45–49.
- [11] Kocamis H, Killefer J. Myostatin expression and possible functions in animal muscle growth[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2002, 23(4): 447–454.
- [12] 汤青萍, 章双杰, 宋迟, 等. 不同鹅种肌肉生长抑制素基因表达差异研究[J]. 现代农业科技, 2012(23): 257–259.
- [13] 张冉, 林浴霜. 不同品种鸡 MSTN 基因表达差异的研究[J]. 中国家禽, 2012, 34(6): 61–63.
- [14] Wang Y S, Hou S S, Huang W, et al. Molecular cloning of myostatin partial cDNA of Beijing duck and its expression in breast muscle[J]. Agricultural Sciences in China, 2006, 5(6): 468–472.
- [15] Amali A A, Lin C J, Chen Y H, et al. Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1[J]. Developmental Dynamics: an Official Publication of the American Association of Anatomists, 2004, 229(4): 847–856.
- [16] Rescan P Y, Jutel I, Rallièrre C. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. The Journal of Experimental Biology, 2001, 204(Pt 20): 3523–3529.
- [17] Østbye T K, Galloway T F, Nielsen C, et al. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues [J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 268(20): 5249–5257.
- [18] 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* [J]. Endocrinology, 2001, 142(4): 1412–1418.
- [19] Kocabas A M, Kucuktas H, Dunham R A, et al. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Biochimica et Biophysica acta, 2002, 1575(1/2/3): 99–107.
- [20] Maccatrozzo L, Bargelloni L, Patarnello P, et al. Characterization of the myostatin gene and a linked microsatellite marker in shi drum (*Umbrina cirrosa*, Sciaenidae) [J]. Aquaculture, 2002, 205(1/2): 49–60.
- [21] 沈丽红, 熊良伟, 唐永凯, 等. 奥利亚罗非鱼 MSTN 基因结构及其 SNPs 的筛选[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(2): 157–161.
- [22] 郁建锋, 张营, 王星果, 等. 鳃肌肉生长抑制素(MSTN)基因的克隆及其组织特异性表达分析[J]. 水产学报, 2010, 34(10): 1486–1494.
- [23] 张锐, 孙美榕, 邓思平, 等. 军曹鱼肌生成抑制素基因的克隆与序列分析[J]. 生物技术通报, 2008(21): 144–148.
- [24] 徐建勇, 陈松林. 牙鲆肌肉生长抑制素(MSTN)基因克隆[J]. 水产学报, 2008, 32(4): 497–506.
- [25] 邓思平, 李嘉颖, 张婉玲, 等. 勒氏笛鲷(*Lutjanus russellii*)肌肉生长抑制素基因的克隆与分析[J]. 广东海洋大学学报, 2011, 31(6): 20–25.
- [26] 朱媛媛, 梁宏伟, 李忠, 等. 黄颡鱼 MSTN 基因多态性及其与生长性状的相关性分析[J]. 遗传, 2012, 34(1): 74–80.
- [27] 彭扣, 陈伟伟, 胡炜, 等. 泥鳅肌肉生长抑制素基因片断的克隆及其表达[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 145–151.
- [28] 叶寒青, 陈松林. 真鲷肌肉生长抑制素(MSTN)基因的克隆及表达分析[J]. 高技术通讯, 2006, 16(7): 718–724.
- [29] Liu L, Yu X, Tong J. Molecular characterization of myostatin (MSTN) gene and association analysis with growth traits in the big-head carp (*Aristichthys nobilis*) [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39: 9211–9221.
- [30] 晁燕, 张辉, 祁得林, 等. 黄河裸裂尻鱼肌肉生长抑制素基因克隆及表达分析[J]. 动物学研究, 2012, 33(5): 473–480.
- [31] 毛亮, 徐亚欧, 杨孔. 藏鸡 MSTN 基因克隆与 mRNA 组织表达谱分析[J]. 中国家禽, 2011, 33(16): 21–25.
- [32] 胡兰, 郭东新, 胡锐, 等. 大骨鸡中 MSTN 基因表达规律性的研究[J]. 动物科学与动物医学, 2003, 20(11): 42–44.
- [33] 罗钧秋, 陈代文. 肌肉生长抑制素(MSTN)对肌肉调控的分子作用机制[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007(7): 36–38.
- [34] 徐磊, 刘波, 谢骏, 等. 甘露寡糖对异育银鲫生长性能、免疫及 HSP70 基因表达的影响[J]. 水生生物学报, 2012, 36(4): 656–664.
- [35] 梁婧娟, 陈志成, 郑玉才, 等. 藏系绵羊 MSTN 基因在不同年龄不同组织的表达定量研究[J]. 农业科学与技术: 英文版, 2011, 12(4): 608–612.
- [36] Ji S, Losinski R L, Cornelius S G, et al. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation [J]. American Journal of Physiology, 1998, 275: R1265–R1273.
- [37] 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[J]. 水生生物学报, 2007, 31(5): 643–648.
- [38] 邵芳, 卢祥云, 顾志良. 鱼类 MSTN 基因的研究进展[J]. 常熟理工学院学报, 2011, 25(8): 76–80.