

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

郁建锋^{1,2}, 张 营², 王星果², 徐建荣², 卢祥云², 李建林¹, 顾志良^{2*}

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水鱼类遗传育种和
养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;
2. 常熟理工学院生物科学与工程系, 江苏 常熟 215500)

摘要:以鳃肌肉总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 和 RACE 的方法, 获得了鳃肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)基因的 3 个重叠片段, 测序后拼接得到 2 177 bp 全长 cDNA 序列, 其包含了 5'端非翻译区的 89 个核苷酸和 3'端非翻译区 1 052 个核苷酸以及 1 125 个核苷酸的开放性阅读框, 翻译编码 375 个氨基酸, 其中前 22 个氨基酸为鳃 MSTN 的信号肽。鳃 MSTN 具有 MSTN 的共同特征, 有蛋白酶水解位点 RIRR 和在 C 端生物活性区含 9 个保守的半胱氨酸残基。核苷酸和氨基酸同源性分析发现鳃 MSTN 与厚颌鲂、草鱼和鲤等鲤形目鱼类的同源性较高, 与鲈形目的同源性较低, 与哺乳动物和鸟类的同源性最低; 系统发育分析表明鳃 MSTN 与厚颌鲂亲缘关系最近。半定量 RT-PCR 分析表明, 该基因在肌肉和脑中表达量最高, 在心肌中也有较高表达, 在肝脏、肠、鳃和肾等组织中未见明显表达, 此结果表明鳃 MSTN 基因除对肌肉生长发育有调控作用以外, 可能还有其他功能。

关键词:鳃; 肌肉生长抑制素; 开放性阅读框; 表达

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标识码: A

肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)基因是 McPherron 等^[1]首先从小鼠骨骼肌 cDNA 文库中克隆的基因, 属于转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 超家族中的一个成员。具有典型的 TGF- β 超家族成员的结构特点: 在 C-末端有保守的蛋白酶水解位点 RXXR; C-末端有 9 个半胱氨酸位于形成“半胱氨酸节点”; 其 C 端通过形成二硫键组成具有生物学活性的二聚体发挥功能。利用基因敲除技术研究它的功能发现, MSTN 基因敲除的小鼠是正常野生型小鼠大小的 2~3 倍, 其肌肉细胞增生、肥大, 整个身体的骨骼肌量明显增加, 这表明 MSTN 在调控骨骼肌肉的生长发育中起着十分重要的作用^[2-3]。

MSTN 在鱼类中的研究也越来越多, 现在已经 在斑马鱼 (*Danio rerio*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*)、金头鲷 (*Sparus aurata*)、罗非鱼 (*Tilapia mossambica*)^[4] 和鲤

(*Cyprinus carpio*) 等鱼类中克隆到 MSTN 基因。鱼类 MSTN 除在骨骼肌表达以外, 还可在鱼类的其它多个组织如肝、心、胃、鳃、卵巢、精巢、肾、肌肉、眼和脑等中表达, 与哺乳类的表达谱有着差异性。在斑马鱼中用肌肉特异启动子驱动 MSTN 基因前肽过表达^[5] 和 RNAi^[6] 技术来抑制 MSTN 的功能, 发现斑马鱼胚胎发育过程中的肌肉发育和生长得到了提高, 甚至引起肌肉增生或肥大。可见 MSTN 作为一种肌肉生长抑制素对鱼肌肉细胞的生长、发育也有着重要的作用, 因此研究 MSTN 在成年肌细胞中的功能和表达调控对渔业生产有重要意义。

鳃 (*Elopichthys bambusa*) 属鲤形目 (Cypriniformes), 鲤科 (Cyprinidae), 雅罗鱼亚科, 鳃属, 为江河、湖泊中大型经济鱼类之一。由于过去将鳃作为“害鱼”而清除和近年来随着自然环境的恶化、捕捞强度的增大等因素, 鳃资源遭到了

收稿日期:2010-06-28 修回日期:2010-08-03

资助项目:农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放基金资助(BZ2009-14)

通讯作者:顾志良, E-mail: Zhiliangu88@hotmail.com

严重的破坏,种群数量急剧下降,许多水域已经很难觅其踪影,现已被列入国家重点保护濒危及受威胁水生物种名录^[7]。鳃 MSTN 基因的研究还未见报道,鉴于 MSTN 基因在水产应用中的重要意义,以及我国鳃育种中的现状,对鳃 MSTN 基因的克隆、组织表达情况的研究,将为进一步分析该基因对鳃生长发育的功能奠定基础,对鳃的繁殖和育种工作起到积极的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及总 RNA 提取

鳃由江苏省苏州市水产工程中心提供,鱼龄为 3 个月,取其肌肉、脑、肝脏、心脏、鳃、肠和肾脏等 7 个组织,液氮速冻后于 -80 °C 冰箱中保存。采用 RNAiso Reagent (TaKaRa) 分别提取上述组织的总 RNA,并用 Dnase I 处理纯化后保存于 -80 °C 冰箱。

1.2 鳃 MSTN 部分编码序列的扩增

按反转录试剂盒 (TaKaRa RNA PCR Kit Ver. 3.0.) 要求进行反转录反应,反应体系:2 μL MgCl₂ (25 mmol/L), 1 μL 10 × RT Buffer, 1 μL dNTP Mixture (10 mmol/L each), 0.25 μL RNase Inhibitor, 0.5 μL AMV Reverse Transcriptase, 0.5 μL Random 9 mers, 1 μg 总 RNA, 加 RNase Free ddH₂O 至总反应体积为 10 μL。反应条件:30 °C × 10 min; 42 °C × 30 min; 99 °C × 5 min; 5 °C × 5 min。根据 GenBank 登录的石首鱼 (AF316882)、斑马鱼 (AF019626) 等的 MSTN 基因序列设计引物 gymstnpf: 5'-cgtcttgcaagtatagac-3'; gymstnpr: 5'-gcatgttgatggcgacatc-3' 用于扩增鳃 MSTN cDNA 的部分序列,反应体系:10 × PCR Buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTP Mixture 2 μL (2.5 mmol/L each), 10 μmol/L 引物 gymstnpf/gymstnpr 各 1 μL, rTaq (5 U/μL) 1 μL, 1 μL cDNA, dd H₂O 17.3 μL; PCR 程序:94 °C 预变性 3 min; 94 °C × 30 s, 56 °C × 30 s, 72 °C × 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 8 min。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测,胶回收目的片段,并克隆入 pMD18-T 后测序 (上海桑尼生物公司测序)。

1.3 RACE 扩增鳃 MSTN mRNA 的 5' 端和 3' 端序列

根据获得的部分鳃 MSTN 基因的序列设计用于 5'-RACE 和 3'-RACE 的特异性引物: gymstn5-

out (5'-actctgcaggtgcatgtag-3')、gymstn5-in (5'-actctgaggaattctcgtcg-3')、gymstn3-out (5'-tggttaagacaaccggagac-3')、gymstn3-in (5'-atgcgactacatgcacctg-3'), 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物 3' race outer primer (5'-taccgtcgttccactagtatt-3')、3' race inner primer (5'-cgcgatcctccactagtattcactatagg-3')、5' race outer primer (5'-catggctacatgctgacagccta-3')、5' race inner primer (5'-cgcgatccacagcctactgatgatcagtcgatg-3') 分别来自于 TAKARA 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 和 5'-Full RACE Kit 试剂盒。

5'-RACE 按 TAKARA 5'-Full RACE 试剂盒程序进行。将制备好的 cDNA 用 5' race outer primer/gymstn5-out 进行第一轮扩增,再以 5' race inner primer/gymstn5-in 引物对第一轮的 PCR 产物进行巢式 PCR。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,并回收克隆入 pMD18-T 后测序。

3'-RACE 按 TAKARA 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 试剂盒程序进行。用引物 gymstn3-out/3' race outer primer 对制备的 cDNA 进行第一轮扩增,然后用引物 gymstn3-in /3' race inner primer 进行第二轮巢式 PCR 扩增,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,并回收克隆入 pMD18-T 后测序。

1.4 序列分析

应用 BLAST 工具将获得的鳃 MSTN 基因的 cDNA 在网上进行同源性比对分析,并推断其开放阅读框和编码的氨基酸序列情况。将获得的序列在 DNAMAN5.0 软件上进行分析,并进行物种间同源性比较。利用 MEGA 4.1 软件中的 Kimura 2-parameter 法计算净遗传距离矩阵。以距离矩阵邻接法 (neighbor-joining, NJ) 建系统发生树,通过自引导检验 (bootstrap) 获得系统分支的置信度 (重复次数为 1 000)。

1.5 鳃 MSTN 的组织特异性表达检测

根据获得的鳃 MSTN 基因的 mRNA 全长序列设计特异性引物: gymstnf (5'-cgtcttgcaagtatagac-3') 和 gymstnr (5'-gcatgttgatggcgacatc-3')。RT-PCR 方法检测不同组织 MSTN mRNA 的表达分布,方法如下:反转录按 TaKaRa 反转录试剂盒 (TaKaRa RNA PCR Kit Ver. 3.0.) 进行。RT-PCR 时,以 β-肌动蛋白基因 (β-actin) 为内标,其引物为 BactinF: 5'-ccagatcatgttcgacacctc-3' 和 BactinR: 5'-gaacctctcattgccaatggtg-3'。PCR 反

应体系和条件:0.2 μL *rTaq* 聚合酶(5 U/ μL) (TaKaRa), 2.5 μL 10 \times PCR Buffer (without Mg^{2+}), 2 μL dNTP(2.5 mmol/L each), 1.5 μL MgCl_2 (25 mmol/L), 游引物 *gymstnf* 和 *gymstnr* 各 1 μL (10 pmol/L), 1 μL cDNA, 加灭菌 dH_2O 至 25 μL 。PCR 扩增条件:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; 然后在 95 $^\circ\text{C}$ \times 30 s, 60 $^\circ\text{C}$ \times 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ \times 30 s, 进行 22 次循环(β -*actin* 基因)或 34 循环(*MSTN* 基因); 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min, RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2 结果与分析

2.1 鳃 *MSTN* 部分编码序列的扩增

以鳃肌肉总 RNA 为模板, 进行逆转录反应, 再用引物 *gymstnpf/r* 进行 PCR 扩增, PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。电泳检测结果(图 1) 显示, 得到 450 bp PCR 扩增产物, 与设计的目的片段长度相一致, 经测序后获得了该片段的核苷酸序列, 与其它物种的 *MSTN* 基因进行比对, 确认该序列为鳃 *MSTN* 基因编码区的部分序列。

2.2 鳃 *MSTN* 基因的 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增

以鳃肌肉总 RNA 为模板, 经 5'-RACE 和 3'-

RACE 的各两轮 PCR, 分别获得约在 1.0 kb 和 1.8 kb 较亮的条带, 与试验预期的结果接近(图 2)。通过对上述两个片段回收后克隆到 pMD-18T 载体中, 经测序后获得了该两个片段的核苷酸序列, 与 *MSTN* 基因比对, 确认这两条序列分别为鳃 *MSTN* 基因的 5' 和 3' 端序列。

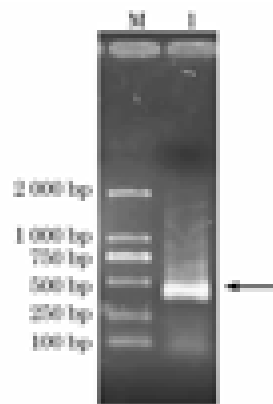


图 1 鳃 *MSTN* 基因部分序列 RT-PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

M:DL-2000 分子量标准; 1:RT-PCR 扩增产物。

Fig. 1 RT-PCR products of *MSTN* gene in *E. bambusa* checked by 1% agarose gel electrophoresis
Marker:DL-2000; 1:RT-PCR products.

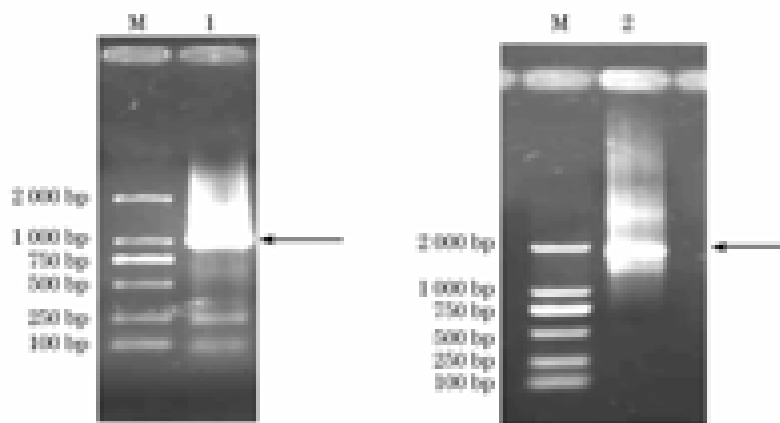


图 2 鳃 *MSTN* 基因 cDNA 5'-端和 3'-端序列的 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增结果

M:DL-2000 分子量标准; 1:5'-RACE 扩增产物; 2:3'-RACE 扩增产物。

Fig. 2 Amplification results of *E. bambusa* *MSTN* cDNA by 5'-RACE and 3'-RACE methods

M:DL-2000; Lane 1:5'-RACE products; Lane 2:3'-RACE products.

2.3 鳃 *MSTN* 基因全长 cDNA 和氨基酸的序列分析

经克隆后测序和拼接, 获得的 2 177 bp 全长 cDNA 序列。包含了 1 128 bp 的开放性阅读框, 其起始密码子是 ATG, 终止密码子是 TGA, 翻译编码 375 个氨基酸, 相应的蛋白质序列见图 3。

经分析信号肽为前 22 个氨基酸, 切割位点在 G22 和 D23 之间; 鳃 *MSTN* 有一个蛋白酶水解位点 RIRR(第 263 ~ 266 位), 在 C 端生物活性区含有 9 个保守的半胱氨酸残基, 分别为第 272、281、282、283、309、313、339、340、372、374 位氨基酸(图 3), 其蛋白等电点约为 6.48, 分子量约为

马鱼 95.12%, 呆鲮鱼 (*Pimephales promelas*) 97.78%, 草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 99.20%, 厚颌鲂 (*Megalobrama pellegrini*) 99.38%。鳃 MSTN 蛋白质除与虹鳟 I 型的氨基酸同源性只有为 30.88% 以外, 与其他鱼类的氨基酸同源性在 66.67% ~ 99.72% 之间, 与厚颌鲂和草鱼 MSTN 的氨基酸同源性最高达 99.72% (表 1)。

表 1 鳃与其它动物 MSTN 基因编码区同源性比较
Tab. 1 Homologous comparisons of MSTN gene CDS between *E. bambusa* and other species

物种 species	登录号 GenBank accession no.	寡核苷酸同源性 (%) nucleotide homology	氨基酸同源性 (%) (去除信号肽) amino acid homology without signal peptide	编码氨基酸的长度 (去除信号肽) length of peptide without signal peptide
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	EU555520.1	99.20%	99.72%	353
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	GQ214769.1	96.99%	98.58%	353
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AF019626.1	95.12%	97.17%	352
红原鸡 <i>Gallus gallus</i>	AY448007.1	63.94%	69.49%	352
稀有鮡鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	FJ482232.1	98.58%	98.87%	353
人 <i>Homo sapiens</i>	NM005259.2	64.19%	68.63%	357
露斯塔野鲮 <i>Labeo rohita</i>	GQ332409.1	96.72%	97.73%	352
厚颌鲂 <i>Megalobrama pellegrini</i>	GU553284.1	99.38%	99.72%	353
美洲狼鲈 <i>Morone americana</i>	AF290911.1	76.57%	85.03%	354
条纹鲈 <i>Morone chrysops</i>	AF197194.1	76.37%	83.10%	355
黑眉鲈 <i>Morone saxatilis</i>	AF290910.1	76.48%	85.03%	354
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NM010834.2	63.25%	66.95%	357
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> 1	AF278606.1	32.09%	30.88%	128
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> 2	AF273036.1	79.96%	88.10%	351
呆鲮鱼 <i>Pimephales promelas</i>	EU714297.1	97.78%	97.73%	353
岩原鲤 <i>Procypris rabaudi</i>	GU553283.1	96.81%	98.30%	353
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	AF019624.1	63.42%	66.67%	357
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i> 1a	AJ344158.3	80.32%	88.95%	351
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i> 1b	AJ297267.3	79.88%	86.78%	353
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	AY046314.1	67.99%	72.32%	343
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> 1	AY445322.1	73.54%	81.59%	353
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> 2	AY445321.1	66.49%	68.45%	344
罗非鱼 <i>Tilapia mossambica</i>	AF197193.3	74.18%	83.33%	354
松江鲈 <i>Trachidermus fasciatus</i>	GU198192.1	75.86%	83.33%	354
石首鱼 <i>Umbrina cirrosa</i>	AF316882.1	75.69%	85.31%	354

2.4 鳃 MSTN 的系统发育分析

根据所获得的鳃 MSTN 基因编码区推断的蛋白质氨基酸序列, 与其他物种 MSTN 的进化关系进行分析, 采集 GenBank 中其它物种包括人、小鼠、大鼠、红原鸡、斑马鱼、鲤、石首鱼 (*Umbrina cirrosa*)、罗非鱼、岩原鲤 (*Procypris rabaudi*)、草鱼、厚颌鲂、稀有鮡鲫 (*Gobiocypris rarus*)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)、露斯塔野鲮 (*Labeo rohita*)、虹鳟、美洲狼鲈、松江鲈、金头鲷、大西洋鲑等脊椎动物的 MSTN 蛋白质序列, 去除信号肽后, 利用 MEGA4.1 软件构建了 25 种脊椎动物

MSTN 的分子进化树 (图 4)。结果表明, 鳃 MSTN 与厚颌鲂 MSTN 关系最近, 其先与厚颌鲂、草鱼聚类在一起, 再与其它鲤形目鱼类形成一个大的分支, 并有很高的自展值支持。鳃 MSTN 与另一分支鲈形目鱼类的亲缘关系较远, 与哺乳类和鸟类的更远。物种 MSTN 系统发育与物种间的亲缘关系一致。

2.5 鳃 MSTN 基因的组织表达分析

采用半定量 RT-PCR 方法检测了 MSTN 基因 mRNA 在鳃肾脏、肠、鳃、心脏、肝脏、脑和肌肉等 7 个不同组织的表达情况, 同时以 β -肌动蛋白

基因(β -actin)的表达作为内参照。通过 PCR 条件优化,分别选择 β -actin 基因和 MSTN 基因在扩增进入平台期前的循环数为 22 次和 34 次。电泳结果显示(图 5),分别在约 400 bp、450 bp 获得 β -

actin 和 MSTN 的部分特异性片段,与预期设计的试验结果相符,发现在肌肉和脑中 Myostatin mRNA 表达量最高,心脏组织中的表达量次之,其它组织未发现明显表达。

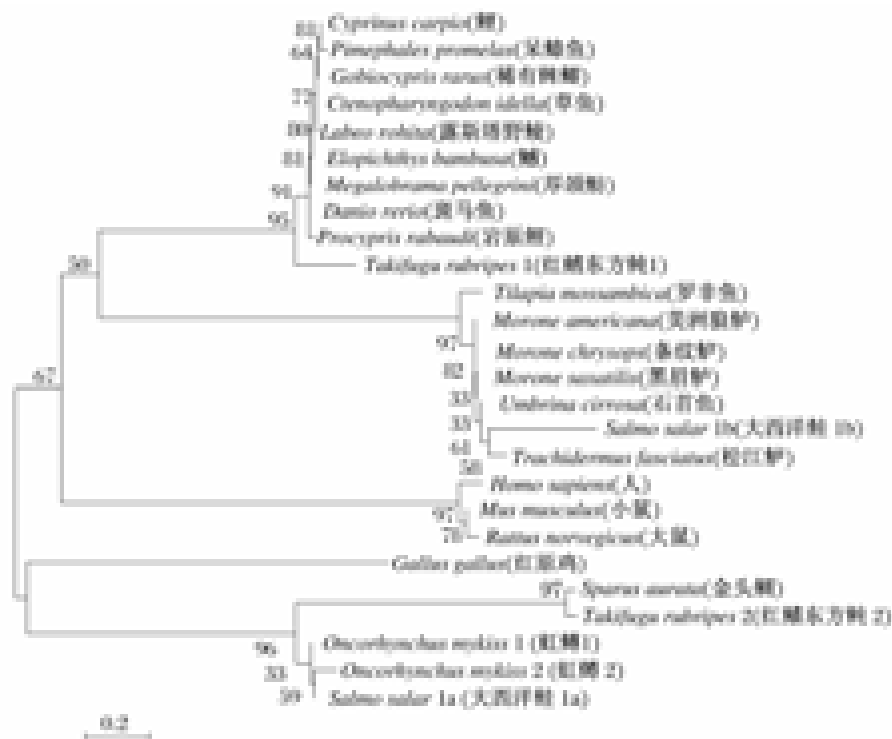


图 4 不同物种推导的 MSTN 氨基酸序列构建的 NJ 树(数字表示 bootstrap 值)

Fig.4 Neighbour-Joining Tree reconstructed based on putative MSTN amino acid residues without signal peptide

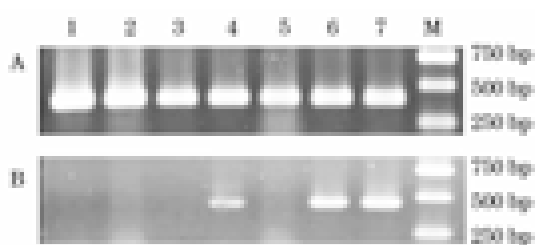


图 5 鳃 MSTN 基因表达的半定量 RT-PCR 检测结果

A: Bact-actin RT-PCR 结果; B: MSTN RT-PCR 结果。

M: DL-2000 分子量标准; 1. 肾脏; 2. 肠; 3. 鳃; 4. 心脏; 5. 肝脏; 6. 脑; 7. 肌肉。

Fig.5 Detection of MSTN gene expression in *E. bambusa* by semi-quantitative RT-PCR

A: Bact-actin RT-PCR; B: MSTN RT-PCR.

M: DL-2000; 1. kidney; 2. intestine; 3. gill; 4. heart; 5. liver; 6. brain; 7. muscle.

3 讨论

获得的全长鳃 MSTN 基因 cDNA 所编码的氨

基酸序列中含有一个蛋白酶水解位点 RIRR,在 C 端生物活性区含有 9 个保守的半胱氨酸残基,并且整条多肽链含有两个典型的 TGF- β 蛋白结构域,即 TGF- β 功能域和 TGF- β 前肽区域,与其它物种的 MSTN 蛋白结构特点相一致,因此获得的鳃 MSTN 基因属于 TGF- β 超家族。

目前在鱼类中 MSTN 被广泛克隆,而且发现在鱼类中存在着 MSTN 的两个异构体。在斑马鱼、虹鳟、大西洋鲑、罗非鱼中都获得了两种 MSTN,而且发现两者间的同源性较高,有学者认为 MSTN-2 是由 MSTN-1 演化而来的^[8-16]。但两者可能在对鱼类胚胎发育和成体中的调节机制有所不同^[17]。与其他物种的 MSTN 基因序列及氨基酸序列比较分析,本研究克隆得到的鳃 MSTN 基因序列同鲤形目鱼类的亲缘关系最近,尤其与如厚颌鲂和草鱼同源性最高,而和其他鱼类、哺乳类及鸟类亲缘关系相对较远,这和鳃属鲤科鱼类的分类地位一致。进一步比对分析发现所获得的

鳃 *MSTN* 与其他物种的 *MSTN-1* 同源性较高,推测所克隆的为鳃 *MSTN-1* 基因。至于鳃是否存在 *Myostatin-2*, 还需进一步的研究。

MSTN 在哺乳动物中主要表达于骨骼肌中,如小鼠中 *MSTN* 只在骨骼肌中表达^[1],也有报道认为 *MSTN* 还在牛的心肌细胞、蒲肯野氏纤维^[18]和猪的乳腺中^[19]表达。鱼类 *MSTN* 基因的组织表达与哺乳类存在差异,有其独特的表达特点^[8]。同时 *MSTN* 在鱼类与哺乳动物中的机理可能也有一定的差异,如在青鳉 (*Oryzias latipes*) 中 *MSTN* 功能的抑制并不表现出双肌现象^[20]。研究发现斑马鱼 *MSTN* 除在骨骼肌中表达以外,还在肝、心、胃、鳃、肾、脑和生殖器官中表达^[5]。在大西洋鲑中也存在两种 *MSTN* 异构体,两者都不限于在骨骼肌中表达,包括白肌、肠、脑、腮、舌和眼均有表达,*MSTN-1* 还在红肌、心脏、脾脏、卵巢组织中表达。鲤 *MSTN* 主要在肌肉和脑部表达,其他组织无表达^[21]。通过对鳃 *MSTN* 组织表达分布检测,发现该基因在骨骼肌肉和脑中表达较高,在心肌也有较高的表达,在其它组织肾脏、肠、鳃和肝脏未见表达。这也暗示鳃 *MSTN* 的功能可能并不局限在对肌细胞生长抑制,还可能在如神经系统等其他组织和细胞中发挥一定的作用,但其主要的功能还是与肌肉发育、生长有关。用转 *MSTN* 前肽基因^[5] 和 RNAi^[6] 等技术抑制 *MSTN* 的功能,发现可以促进斑马鱼胚胎发育过程中的肌肉发育和生长,引起肌肉增生或肥大。可见,鳃 *MSTN* 基因的克隆可为进一步研究鳃肌肉生长及该基因的表达调控机理奠定基础。

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-beta superfamily member [J]. Nature, 1997, 387 (6628) : 83 - 90.
- [2] Westhusin M. From mighty mice to mighty cows [J]. Nat Genet, 1997, 17 (1) : 4 - 5.
- [3] Lee S J, McPherron A C. Myostatin and the control of skeletal muscle mass [J]. Curr Opin Genet Dev, 1999, 9 (5) : 604 - 607.
- [4] Gregory D J, Waldbieser G C, Bosworth B G. Cloning and characterization of myogenic regulatory genes in three Ictalurid species [J]. Animal Genetics, 2004, 35 (6) : 425 - 430.
- [5] Xu C, Wu G, Zohar Y, et al. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish [J]. J Exp Biol, 2003, 206 (22) : 4067 - 4079.
- [6] Acosta J, Carpio Y, Borroto I, et al. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish siant phenotype [J]. J Biotechnol, 2005, 119 (4) : 324 - 331.
- [7] 段辛斌, 陈大庆, 刘绍平, 等. 长江三峡库区鱼类资源现状的研究 [J]. 水生生物学报, 2002, 26 (6) : 605 - 610.
- [8] Maccatrozzo L, Bargelloni L, Cardazzo B, et al. A novel second myostatin gene is present in teleost fish [J]. FEBS Lett, 2001, 509 (1) : 36 - 40.
- [9] Roberts S B, Goetz F W. Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms [J]. FEBS Lett, 2001, 491 (3) : 212 - 216.
- [10] 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* [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2001, 129 (2 - 3) : 597 - 603.
- [11] 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]. Endocrinol, 2001, 142 (4) : 1412 - 1418.
- [12] Rescan P Y, Jutel I, Ralliere C. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. J Exp Biol, 2001, 204 (20) : 3523 - 3529.
- [13] Garikipati D K, Gahr S A, et al. Identification, characterization, and quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and myostatin-1b genes [J]. J Endocrinol, 2006, 190 (3) : 879 - 888.
- [14] 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 [J]. Endocrinol, 2007, 148 (5) : 2106 - 2115.
- [15] Rodgers B D, Garikipati D K. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review [J]. Endocrine Reviews, 2008, 29 (5) : 513 - 534.
- [16] Ostbye 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]. Eur J Biochem, 2001, 268 (20) : 5249 - 5257.

- [17] Helterline D L, Garikipati D, Stenkamp D L, *et al.* Embryonic and tissue-specific regulation of myostatin -1 and -2 gene expression in zebrafish [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2007, 151(1): 90-97.
- [18] Sharma M, Kambadur R, Matthews K G, *et al.* Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct [J]. *J Cell Physiol*, 1999, 180(1): 1-9.
- [19] Ji S, Losinski R L, Cernelius R L, *et al.* Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation [J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(4): 1265-12731.
- [20] Sawatari E, Seki R, Adachi T, *et al.* Overexpression of the dominant-negative form of myostatin results in doubling of muscle-fiber number in transgenic medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2010, 155(2): 183-189.
- [21] 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.

欢迎订阅 2011 年《海洋渔业》

《海洋渔业》创刊于 1979 年,是中国科学技术协会主管、中国水产学会和中国水产科学研究院东海水产研究所主办的学术期刊。《海洋渔业》主要刊载水产生物学、水产生物病害与防治、水产生物营养与饲料、渔业生态与渔业水域生态环境保护、海洋水产资源开发利用与保护、渔具与渔法、海水养殖与增殖、水产品保鲜与综合利用、渔业机械与仪器等方面的水产基础理论研究和水产应用基础研究的论文、综述和简报,读者对象主要为海洋水产科技工作者、水产院校师生和渔业行政管理人员等。

《海洋渔业》于 2006 年被“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)收录,2009 年被中国科学引文数据库(CSCD)(扩展库)(2009-2010 年)和《中文核心期刊要目总览》收录,还先后被《中国期刊全文数据库》(CJFD)、《万方数据-数字化期刊群》、《中文科技期刊数据库》、联合国《水科学和渔业文摘》(ASFA)等期刊数据库收录,2009 年被中国科技协会学会学术部评定为“中国科协示范精品科技期刊”。

《海洋渔业》为国内外公开发行人,国内统一刊号:CN 31-1341/S,国际标准刊号:ISSN 1004-2490,邮发代号:4-630。季刊,大 16 开,120 页,逢季中月 25 日出版。定价:16 元/册。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款至编辑部订阅。

编辑部地址:上海市军工路 300 号,邮编:200090

电话:021-65680116,021-65684690×8048,传真:021-65683926

E-mail:haiyangyue@126.com

Website:www.eastfishery.ac.cn

Cloning and expression analysis of the myostatin gene in *Elopichthys bambusa*

YU Jian-feng^{1,2}, ZHANG Ying², WANG Xing-guo², XU Jian-rong²,
LU Xiang-yun², LI Jian-lin¹, GU Zhi-liang^{2*}

(1. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture,
Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. Department of Life Science and Technology, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

Abstract: In order to clone full-length myostatin gene and characterize its tissue expression profile in *E. bambusa*, RT-PCR and rapid-amplification of cDNA ends (RACE) were used to acquire full-length cDNA. A full-length of 2 177 bp myostatin cDNA sequence in *E. bambusa* was cloned, which included a 1 125 bp complete ORF encoding a 375 amino acids peptide, a 89 bp long 5'-untranslated region, and a 1 052 bp long 3'-untranslated region. The 375 amino acids long putative peptide contains a 22 amino acids long signal peptide, a conserved RIRR proteolytic processing site, and 9 conserved cysteine residues in the C terminal of the protein. The *E. bambusa* MSTN had high similarity to the *Megalobrama pellegrini*, *Ctenopharyngodon idella*, *Cyprinus carpio* myostatin while had low similarity to the *M. perciformfishes* myostatin and lower similarity to the mammalian and bird myostatin. The phylogenetic analyses showed that the *E. bambusa* myostatin had closest relationship with the *M. pellegrini* myostatin. Furthermore, myostatin mRNA tissue expression profile was assessed by semi-quantitative RT-PCR. In the seven examined tissues, the myostatin gene was expressed strongly in muscle and brain, weakly in heart but not expressed in kidney, intestine, gill, heart and liver. These results suggested that the fish myostatin gene might not only play roles in muscle development but also contribute to other biological functions.

Key words: *Elopichthys bambusa*; myostatin; open reading frame (ORF); expression

Corresponding author: GU Zhi-liang. E-mail: Zhilianggu88@hotmail.com