

文章编号: 1000-0615(2018)06-0817-11

DOI: 10.11964/jfc.20171010990

九孔鲍MSTN基因cDNA克隆及表达

艾加林, 栗志民*, 刘建勇

(广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088)

摘要: 肌肉生长抑制素(MSTN)是转化生长因子 β 超家族(TGF- β)中参与动物肌肉生长的重要调控因子。为了解MSTN基因在九孔鲍中的功能, 本研究采用cDNA末端快速扩增(RACE)技术从九孔鲍右侧壳肌中获得了MSTN基因cDNA全长, 并运用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术检测了MSTN在各组织和发育时期的表达水平。结果显示, 九孔鲍cDNA全长3 755 bp, 其中5'非编码区(5'UTR)324 bp, 3'非编码区(3'UTR)1 985 bp, 开放阅读框(ORF)1 446 bp, 编码481个氨基酸, 分子质量为54.96 ku, 理论等电点pI为9.41; 具有N端信号肽(1~17 aa)、TGF- β 前肽区域(157~367 aa)和成熟肽区域(379~481 aa), 以及蛋白酶水解位点RRPR(364~368 aa)和C端生物活性区9个保守的半胱氨酸残基, 符合TGF- β 超家族蛋白典型结构特征, 且预测到2个新的蛋白酶水解位点RQRR(120~124 aa)、RYRR(235~239 aa)。系统进化树结果显示, 九孔鲍MSTN基因和红鲍MSTN基因聚为一支。qRT-PCR结果表明, 九孔鲍MSTN基因在检测的6个组织中均表达, 且在足、右侧壳肌、外套膜中高表达, 在鳃、性腺、肝脏中低表达; 在检测的7个发育时期均表达且在受精卵、原肠胚、稚鲍时期高表达, 在卵、4细胞期、8细胞期、幼鲍时期表达量较低。研究表明MSTN基因可能在九孔鲍肌肉生长中具有重要作用。

关键词: 九孔鲍; 肌肉生长抑制素; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

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 超家族(TGF- β)成员, 主要功能是抑制肌细胞的增殖, 为肌肉生长发育的负调控因子^[1]。MSTN基因突变使MSTN蛋白失去抑制肌细胞生长的功能, 从而使肌肉含量增加^[2], 如牛的MSTN基因突变, 产生具有双肌表型的比利时蓝牛以及肌肉含量比普通牛增加20%的皮埃蒙特牛^[3]。通过基因编辑技术或利用RNAi使MSTN基因失去抑制作用, 也可使青鳉(*Oryzias latipes*)^[4]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[5-6]等动物的肌肉含量增加。由于MSTN突变可使肌肉含量增加, 进而提高肉产量和经济效益, MSTN基因成为一个主要的研究热点, 在哺乳动物^[7-8]、鱼

类^[9-10]等脊椎动物, 墨吉明对虾(*Fenneropenaeus merguensis*)^[11]、海参(*Apostichopus japonicus*)^[12]和海湾扇贝(*Argopecten irradians*)^[13]、华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)^[14]等无脊椎动物中已有相关研究。贝类MSTN基因与其他物种类似, 具有N端信号肽, C端蛋白酶水解位点(RXXR)和9个保守的半胱氨酸残基等TGF- β 超家族典型结构^[13]。

MSTN基因在贝类中的表达模式与哺乳动物不同, 但与鱼类及其他无脊椎动物类似, 在贝类闭壳肌、足、外套膜、鳃、性腺及肝脏等组织中均表达^[15-16]。研究结果显示MSTN基因在很多物种中存在可变剪接现象, 鸟类MSTN基因可通过不同的剪接位点, 形成具有不同活性的蛋白调控肌细胞生长^[17], 墨吉明对虾MSTN基因中

收稿日期: 2017-10-07 修回日期: 2018-01-18

资助项目: 深圳市大鹏新区产业发展专项(KY20170211)

通信作者: 栗志民, E-mail: lizhimin811@163.com

存在2种剪接方式,可能与蜕皮有关^[11],而在贝类中,*MSTN*基因也存在不同剪接方式^[18-19],估计贝类*MSTN*基因还具有一些其他功能。目前*MSTN*基因已被选作一些贝类遗传改良的重要候选基因^[20-21],分析*MSTN*基因在贝类生长发育中的作用,对理解*MSTN*基因在贝类中的功能具有重要意义。

九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)属于软体动物门(Mollusca),腹足纲(Gastropoda),前鳃亚纲(Prosobranchia),原始腹足目(Archaeogastropoda),鲍科(Haliotidae),主要分布于日本、韩国及中国南方各省^[22],具有较高的营养和经济价值,然而由于病害频发、种质退化,九孔鲍产量逐年下降,限制了九孔鲍产业的发展^[23],目前已通过杂交^[24]、选择^[25]及标记辅助选择^[26]等方法对九孔鲍进行遗传改良。鉴于*MSTN*基因在肌细胞生长过程中具有重要作用,本研究运用RACE原理克隆出了九孔鲍*MSTN*基因的cDNA全长,并通过qRT-PCR技术检测了其在不同组织和发育时期的表达水平,初步探究了*MSTN*基因在九孔鲍中的功能,为研究九孔鲍遗传育种提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

九孔鲍采自广东湛江硇洲岛养殖群体,体质量(11.42±1.24)g,壳长(50.7±2.52)mm,壳宽(31.46±1.6)mm。选取活力强、健康的5个成鲍,解剖后分别取右侧壳肌、鳃、外套膜、肝脏、足、性腺,亲鲍催产受精后分别收集卵、受精卵、4细胞、8细胞、原肠胚(n>500),稚鲍(n>5)、幼鲍(n>5)分别取右侧壳肌,保存于RNAhold(全式金,北京)中,4℃保存过夜后转移至-20℃短期保存。

1.2 总RNA提取和cDNA合成

按照TransZol Up Plus RNA Kit(全式金,北京)试剂盒使用说明书提取九孔鲍右侧壳肌总RNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,并用核酸微量定量仪(Nanodrop 2000 Thermo Scientific,美国)检测RNA浓度,保证A260/280为1.8~2.0。根据TransScript one-step gDNA Removal and cDNA Synthesis supermix(全式金,北京)反转录试剂盒说明书,利用检测合格的总RNA(1 μg)

和Oligo(dT)Primer合成cDNA 20 μL,同时按SMARTer™ RACE 5'、3'Kit user manual(TaKaRa,大连)分别合成5'、3'RACE cDNA模板,-20℃保存。

1.3 *MSTN*基因cDNA全长克隆

根据GenBank中缢蛏(*Sinonovacula constricta* AHH32929.1)、合浦珠母贝(*Pinctada martensi* AIA98698.1)、紫扇贝(*A. purpuratus* AGO15291.1)、海湾扇贝(AY553362.1)、瘤背石磺(*Onchidium struma* AOR06340.1)、红鲍(*H. rufescens* AIB06685.1)的*MSTN*基因序列,通过比对后选择保守序列设计引物*MSTN*-F,*MSTN*-R(10 μmol/L)(表1),PCR反应条件为94℃预变性4 min;94℃30 s,53℃30 s,72℃1 min,40个循环,72℃10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测、切胶回收后,与pEASY-T1(全式金,北京)载体连接转化培养,挑选阳性克隆送上海生工生物工程股份有限公司测序,获得372 bp九孔鲍*MSTN*基因序列。

根据已获得片段设计巢式PCR引物*MSTN*-3F1、*MSTN*-3F2,以及SMARTer™ RACE提供引物UPM Mix、UPM(表1)分别扩增3'端,第一轮利用SMARTer™ RACE 5'、3'Kit user manual(TaKaRa,大连)中SeqAmp DNA Polymerase进行扩增,程序为94℃30 s,72℃3 min,5个循环;94℃30 s,70℃30 s,72℃3 min,5个循环;94℃30 s,68℃30 s,72℃3 min,25个循环;将第一轮PCR产物稀释50倍作为第二轮PCR反应模板,利用TaKaRa LA Taq(TaKaRa,大连)进行第二轮扩增,反应程序为94℃30 s,62℃30 s,72℃3 min,35个循环。5'端根据红鲍*MSTN*基因设计引物(表1)利用TaKaRa LA Taq(TaKaRa,大连)分别进行扩增,反应程序为94℃预变性4 min;94℃30 s,50℃30 s,72℃1 min,40个循环,72℃10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测、切胶回收后,与pEASY-T1(全式金,北京)载体连接转化培养,挑选阳性克隆送上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.4 生物信息学分析

测序所得序列通过DNAMAN 6.0,NCBI Blast进行比对,去除接头以及重复序列然后拼接获得全长,利用NCBI ORF Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找基因开放阅读框

表 1 实验中所用的引物序列

Tab. 1 Primers used in this study

引物 primer	引物序列(5'-3') sequence	退火温度/°C T_m	用途 purpose
<i>MSTN</i> -F	AAATAAGATAGCGGGTCAG	53	同源克隆(372 bp)
<i>MSTN</i> -R	CACAATCAACACTCCTCC		
<i>MSTN</i> -3F1	AGATAGCGGGTCAGGTGACATCGGC	70	3'RACE
UPM	long-CTAATACGACTCACTATAGGGC AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT		
<i>MSTN</i> -3F2	TGATGGTATCGCGGTCAGATGCAAG	62	3'RACE
UPM	short-CTAATACGACTCACTATAGGGC		
<i>MSTN</i> -5F1	GTCAGGTGCGTAGCAAAC	50	同源克隆(848 bp)
<i>MSTN</i> -5R2	AGATGATGATGTCGGTTGT		
<i>MSTN</i> -5F3	ACGGATACGCCAAGACAA	50	同源克隆(201 bp)
<i>MSTN</i> -5R4	GTTCCAGTTCGGACAATA		
<i>MSTN</i> -5F5	GCTTCCTCTGACGCTTAT	51	同源克隆(198 bp)
<i>MSTN</i> -5R6	TAGGGCCTTTGGGTTT		
β -actin-F	TGCCCATCTACGAAGGTTACGCC	60	荧光定量内参(200 bp)
β -actin-R	GCTGCTGTGGACATCTCCTGCTC		
<i>MSTN</i> -RF	GTGACTCGAATGGACACGGA	60	荧光定量(114 bp)
<i>MSTN</i> -RR	GCATCTGACCGGATACCAT		

(ORF), SignalP预测信号肽(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)计算分子质量和等电点pI (<http://www.expasy.org/>), ProtParam分析蛋白的理化性质(<http://web.expasy.org/protParam/>), 利用NetPhos 3.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 和 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)进行功能位点预测, CBS Prediction Servers ProP预测蛋白酶水解位点(<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>), 蛋白质结构域用SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), 二级结构预测 SOPMA: (<http://pbil.ibcp.fr/>), 三级结构预测 Phyre2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)。

从 GenBank 下载红鲍 (*MSTN*-like AIB06685.1)、九孔鲍、虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis GDF8*-like XP 021351561.1)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei MSTN*-like AEY11334.1)、墨吉明对虾 (*MSTN* ARB66315.1)、瘤背石磺 (*MSTN* AOR06340.1)、缢蛏 (*MSTN* AHH32929.1)、合浦珠母贝 (*Pinctada martens MSTN*

AIA98698.1)、紫扇贝 (*MSTN* AGO15291.1)、斑马鱼 (*MSTN* AAV30547.1)、斑马鱼 (*GDF8* AAQ11222.1)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss MSTN2* AAK71708.1)、虹鳟 (*MSTN1* AAK71707.1)、智人 (*Homo sapiens GDF8* AAC96327.1)、家牛 (*Bos taurus MSTN* ACS70961.1)的氨基酸序列来构建系统进化树, 多序列比对采用 DNAMAN 6.0 软件, 利用 MEGA 6.0 软件先进行 Clustalw 序列比对后, 使用邻位法 (Neighbor-Joining) 1 000 次 bootstraps 构建系统进化树。

1.5 *MSTN* 基因表达分析

采用 ABI 7500 荧光定量 PCR, 以 β -actin 为内参基因, 利用 *MSTN* 基因序列设计荧光定量引物 *MSTN*-RF、*MSTN*-RR (表 1), 分析九孔鲍不同组织和不同发育时期 *MSTN* 基因表达水平, 每份组织样品 5 个重复, 反应体系: PowerUp SYBR Green Master Mix (2 \times) (TaKaRa, 大连) 5.0 μ L, 引物各 1.5 μ L (1 μ mol/L), cDNA 模板 2.0 μ L (1 ng/ μ L), 反应程序为 50 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s,

60°C 1 min, 40个循环; 95 °C 15 s, 60°C 15 s。

分别以各组织和发育时期中基因表达量最低的为基准, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算基因相对表达量, 数据采用平均值±标准差(mean±SD), 通过SPSS 19.0单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行统计学检验, 差异显著性为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 MSTN基因克隆及序列分析

九孔鲍MSTN基因cDNA全长3 755 bp, 其中开放阅读框(ORF)为1 446 bp, 编码481个氨基酸, 其分子质量为54.96 ku, 理论等电点pI为9.41, 5'非编码区(5'UTR)为324 bp, 3'非编码区(3'UTR)为1 985 bp, 含有3个加尾信号序列AATAAA (2 093、3 706 bp)和ATTAAA (3 257 bp)及PolyA (30 bp)尾(图1)。

采用NetPhos 3.1和NetNGlyc 1.0预测功能位点, 结果显示, 九孔鲍MSTN氨基酸序列中有30个丝氨酸磷酸化位点、22个苏氨酸磷酸化位点、6个酪氨酸磷酸化位点、3个N-糖基化位点。SOPMA分析表明, 九孔鲍MSTN氨基酸二级结构中 α -螺旋占35.34%、 β 转角占6.86%、无规则卷曲占37.42%、延伸链占20.37%。

SignalP和SMART分析显示: N端信号肽序列为1~17 aa, TGF- β 前肽区域为157~367 aa, TGF- β 成熟肽区域为379~481 aa (图1)。通过ProP进行蛋白酶水解位点分析显示: 九孔鲍MSTN氨基酸序列中具有3个蛋白酶水解位点(RXXR): RQRR (120~124 aa), RYRR (235~239 aa)和RRPR (364~368 aa)(图1), 进一步分析发现RRPR (364~368 aa)为TGF- β 超家族物种间保守的蛋白酶水解位点, 位点之后为9个保守的半胱氨酸残基(图2)。通过Phyre2分析显示, MSTN基因

```

1  GCTTCCTCTGACGCTTATAAACTTGTGTTTGAGGGCTAAGAGCCTGGGTCATGCCATACTGTGTTTACTCCATTTCAGCGCGCTGCCTTCAATAGGGACAACCTGAGTGAGTCACAA
117 GCGTGCCGCGGTATATTGTGCTCTGATCATTCCCATTTGGTCAGGTGCGTAGCAAACCTGGAGTTTGAACCCAAAGGCCTACTTTTTACGCTCTGAAAGCCGGACCTAATCCGA
233 TTCAACTGCAGTGAAGCAGCAGTGGAAATGATACAGTTTTACCGGTACCGCCGCCAGATTGTCAGGTATAGTGATGGACA
316 AGTAGTGAAATGTTCTGCGTGTATTTCGTGGTTGTGGCAGCTGTGGCATTGCTGCAGAACTGAAGATGATGGACAGACACCGGTTTACGTC AACGGATCAGCG
1  M F C V Y F V V V A A V G I A A G T E D D G Q T P V Y V N G S A
421 CTCGTACAGCAGATTCTGACAGTTTCTGAACAGACCATTAAAGAACTCAGAAGCTTCTCTAGAAAAGTCAACGTCAGCAACGCCGTAACCTCAACGGCATCG
33  L V Q Q I L T V S E Q T I L R T S E A S L E K S T S A T P V T S T A S
526 ACTGATGAAGCGGCTGAGATTTATCGTAAAACCAAGACAGCAGTGAAGCAAGTCAATGACTGGAGGGACGAAATCAGTTCTGATTGTCGAATACCAACTCGAAA
68  T D E A A E I Y R K T N R P V S K V I D W R D E I S S D L S N T N S K
631 TCAAAAACGAAAATGATTAAGAAGCTTACCAAGGAAAGGGAACGAGAAGAACAAGACGAAACGAAAGGCTGAAGAGAAACGCATGTATATGGCAAGA
103 S K R K M I K K L T K E R E R E E R R Q R R K Q K A E E K R M Y M A R
736 AAAAAATCCCAACTTCAAAGAGCAACATGACAAAAACCTGTCAAGAAAACATGCCCGGAATGTGAAAAGAACTGAAAAGGAAAGCCTGAGAAGATGAGA
138 K K S Q L S K S K H D K T P V K K T C P E C E K K L K K E S L E K M R
841 CGTGAGTCGTTCAAGAAGCAGTTATAGAAAACCTGCTTTGATTGAGTCGCTGTACGAATCCCGTTCTTAACAGGAGATTCTCCGTCATGGAATCATG
173 R E S F K K Q V I E K L R L D L S R P V R I P V L N Q E I L R H G I M
946 GACGACGAATCTGCAGATGACAATGACGGATACGCCAAGACAACCGACATCATCTCCGCGAGCGACATTACAAGAAAATGCAGATACCGGAGGTCGACATGGA
208 D D E S A D D N D G Y A K T T D I I I S A A D I T R K C R Y R R S T G
1051 TGCTTCAAGTTCAATCTCCGAAATAAGATAGCGGGTCAGGTGACATCGGCTGAACTGTTGATCTACAACTCCATGATCCAAATGATGGTCAGCAATCATTCATA
243 C F K F N L R N K I A G Q V T S A E L L I Y K L H D P N D G Q Q S F I
1156 TTGTCCGAACTGGAACGACAAAATTCGAAAACACATGCCAAGGAACATCGTGACTCGAATGGACACGGACATTACTGAAGGATGGTTGACATTTCGAGTGGAC
278 L S E L E R P K F R K H M P R N I V T R M D T D I T E G W L T F R V D
1261 AAAACTGTCCAAAATGGGCTCAAATAGCTACACGAATGATGGTATCGGGTCAGATGCAAGACATGCGCGGGGAGTCCACAAGCAGCTGTACAGGCCAAA
313 K T V Q K W A Q N S Y T N D G I A V R C K T C A R E S H K Q L Y S A K
1366 GAAGGCTACAAGCCTGTCTCATCTGTTACATTAAGCAATGTGCAAAACGCCGACCGGAGGAGTGTGATTGTGATGGTGACAATAGCCGGTGTGCAAAAC
348 E G Y K P V L I V H I K P M S K R R P R R S V D C D G D N S R C C K H
1471 AACTTTGGGTCAAATTCAGTGAATCGATCTCATCCATATCCTTCGTCGGCAGCGGTTGGGCTAATTACTGCACGGGTCGTGTGACTTGATGACGATGGGG

```

(图1 Fig.1)

```

383  N F W V K F S E I D L I H I L R P A G V W A N Y C T G S C D L M T M G
1576  CACTTCAACCACACAGGATTGCTGCAAGGTGCGGTGGAGTGACGTCGCCAACGACACCATACTGCAATTAACACCTGCTGTGGCGCTGTTCGACTCAGT
418  H F N H T G L L Q S V R W S D V A N D T I R N A I T P C C G A V R L S
1681  ACAATGTCACTTCTCTACGCGGATGATCGGGCATCATTCGACAGGCAGAGCTTCTGACCTTGGTGTGAAGAATGGCTGTTGTAATGGTAAACAGTCACC
453  T M S L L Y A D D R G I I R Q A D V P D L G V E E C G C L *
1786  TTGACCTTTTCATACTGCGGTTGCAATACATGCGTTTTTTGTTTTGTTTTAGTGTGTGTTTTTAATGCCTCCGTGAAACGAGCCTCTGTTCATTCCTACTGCTTAGCAA
1901  AGTGATTTAATTGTACCAGTGGCTTAAAGCATCAACATTTGATTGCGCTGTGAACAACCAACATAATCGTGGATATGGGTGAACAATGCCTTTGACGTCATGCTTAATC
2016  AAGAATGCCAATAGTGTATTATTCATGAAAGATTTTCACTCAAGACAAAAAGAACAGTAGTTGTAGGTTTCACAAATAAATTCATCAATGCAACTGCCATAAATGCAGTAT
2131  GAGCACTATAAACGACCGATAACGATGAAGCTAGTGAATTCCTCGGTCGGAATTTATTTAAGGGATTTATGGGAACATTTGGGTAGCGGTTGCTCGTAGCACCAATAACCCGG
2246  TTCGATGGATAAAACTTAAGAAGCAATTTCTTATGCTCTCCGGCCTATAATATTGCTAAAACATTCATTACCCATTGTATGCAAGCTCTGCAAGTATATACGGTGGAT
2361  CGTTACATTACGTTGCTCTCTTCATTCTTTTGTGGTAAGAAGCAACTACCGGATCGGGTGGTCAGGTCGCTGACTGGTTGACACGTTATCGGATCTGATTTT
2476  GCGTAATCTGTCGACGTTTCATGCTTGTACTGATTGTTGGTCCAGCGCAGTTATCTACAGCTGCAGCAATGTAGTGAATATTGCTGAGTGAGCGGTAAAATTAGAC
2591  TCATTATCCACGTGATCATTTGACCGACCAATCAGAGTGGAAATAAGGTATAGCAGATAAGGGTGTACTAAATATTGACCTAAATTCAGCTATACTCCGATAAGCGTGTGT
2705  TACCTCACTTTTCCGACCTCAATACTTATATGGCTAAAGCTAAATCAAAGAATGAAAACGATGCAGGTCACGGAGTGTGGGGCGCTGTTCCACGACACGATCTTGAGGC
2821  TATGTTTGTGCGTGTGTTCTTGTAAAGCAATATCACCTTGTGGAGCAAGTATTTTTATATGCTCTTAGTAAAGCAGCTTATCTCGATAAACCCGTTGTGTAGTACCAT
2936  ACTGTAACGCAGTAAACCTCGTTCAGTGGTACTGTCTTAGTGGTCCAGGCCTGGATGTTCAATCTCTCTTAGCGCTAAATAGTCGTGAGTCAATGTTAATGTATGCACT
3051  TAGCACTATCTTAGCGCTAAGAGAGCTTCGAAAATCAGGCCAGGAACCCATTTACATAGCTATCGTAGCGCTACGACTGACGTACCCCTATACTCGAGTGTCCATTTTTCC
3166  TGATCCATCTCATATATATAGTTCGAATATAGATGTGCAACTTGCTGCTGTTTCGAAGGAAAGTGTGGTCACTTCTGCTTTTGCATAAATAATTCATCATTTCACGACTC
3281  TGTAACCCGATTTTCGACACAGTTGTGTTTACTAATATGTTTTCTGATCTCTCTAGACGCCATCATAGTGTAGGTTGCTCCCGAGAACACACTGTAGGATAAATGAC
3396  GGTGAGCTGGTTGCGGAGGTTTCGCTGTGCAAGTGCAGATGTTAGCTTGTGCGCTGTTTTGCCAAGCGCAGGCTTGTGCCCCCTCAGCTTTATTGTCCAAGGTTCTGC
3511  CTGAAAATCGTGGTATTATGTGACTCGCCATTACAATGCAAAATCAACAATGCAAAATCTCACAGCAACATTATACTGGACATTTTACTGATAGTATTTGAATTTTTTGAAA
3626  TGTGTTTTAACACGCTGAGCCTCAAAGCAGCTGTTGAAGACTGTAGTGTACTTTGTTACTTAGTGTCAATTTCTTAATAAAATTTGCAACTTTATAAAAAAAAAAAAAA
3741  AAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 九孔鲍 *MSTN* 基因 cDNA 全长及氨基酸序列

浅灰色标注起始密码子和终止密码子, 方框标注信号肽, 单下划线标注 *TGF-β* 前肽区, 双下划线标注 *TGF-β* 成熟肽区域, 深灰色标注蛋白酶水解位点(RXXR), 灰色方框标注9个保守的半胱氨酸残基, 波浪线标注加尾信号

Fig. 1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of *MSTN* cDNA from *H. diversicolor supertexta*

Start codon and stop codon are shown in light gray, the predicted signal peptide and *TGF-β* prepeptide domain are shown in the boxed and single underline, respectively, *TGF-β* superfamily domain and proteolytic processing site (RXXR) are shown in double underline and dark gray, respectively, nine conserved cysteine residues and putative eukaryotic polyadenylation signal are shown in the boxed with gray and wavy line, respectively

三级蛋白结构与 *TGFβ-1* 相似。

2.2 *MSTN* 基因同源性及系统进化分析

运用NCBI在线BlastX比对, 结果表明, 九孔鲍 *MSTN* 氨基酸序列与红鲍相似性最高, 为76%, 与其他物种相似性较低。

基于NJ法构建 *MSTN* 氨基酸序列系统进化树, 结果显示, 所有鱼类和无脊椎动物先聚类随后聚在一起形成一支, 哺乳动物单独聚为一支。在无脊椎动物中, 九孔鲍、红鲍、虾夷扇贝; 凡纳滨对虾、墨吉明对虾; 瘤背石磺、缢蛭、合浦珠母贝、紫扇贝各聚为一支(图3)。

2.3 *MSTN* 基因表达分析

通过荧光定量PCR分析九孔鲍 *MSTN* 基因表

达水平, 结果显示, *MSTN* 基因在各组织和发育时期均有表达, 在足、右侧壳肌、外套膜中高表达, 在鳃、性腺、肝脏中低表达(图4); *MSTN* 基因在检测的7个发育时期均表达, 在受精卵、原肠胚、稚鲍时期高表达, 在卵、4细胞、8细胞、幼鲍时期表达量较低(图5)。

3 讨论

转化生长因子β超家族(*TGF-β*)在细胞增殖、生长和分化过程中具有重要作用, 其成员都具有有一些共同的结构特征, N端信号肽、*TGF-β* 前肽区域和C端成熟肽区域先形成前体蛋白, 经过蛋白酶水解加工后, 通过半胱氨酸残基形成具有生物活性的二聚体^[27]。

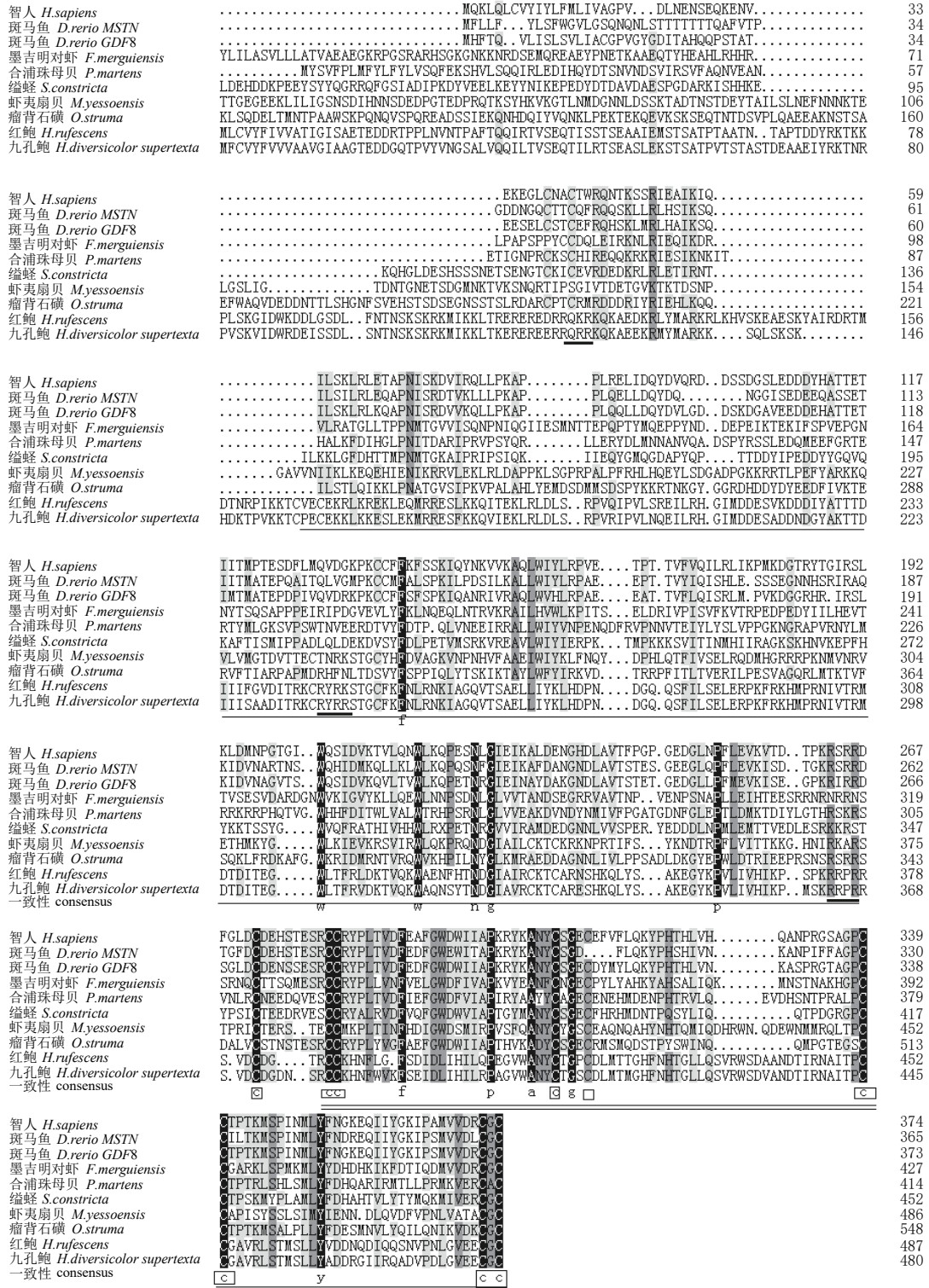


图2 MSTN氨基酸序列比对

粗下划线标注蛋白酶水解位点(RXXR), 方框标注9个保守的半胱氨酸残基, 单下划线标注TGF-β前肽区域, 双下划线标注成熟肽区域, 黑色标注保守氨基酸, 深灰色标注相似性大于75%的氨基酸, 浅灰色标注相似性大于50%的氨基酸

Fig. 2 Multiple sequences alignment of MSTN amino acid sequences from different species

Proteolytic processing site (RXXR) and nine conserved cysteine residues are shown in underline and the boxed,respectively, the predicted TGF-β peptide domain and TGF-β superfamily domain are shown in single underline and double underline respectively, the conserved and identical residues are represented by black shading, the amino acids similarity more than 75% and 50% are represented by dark gery and light grey respectively

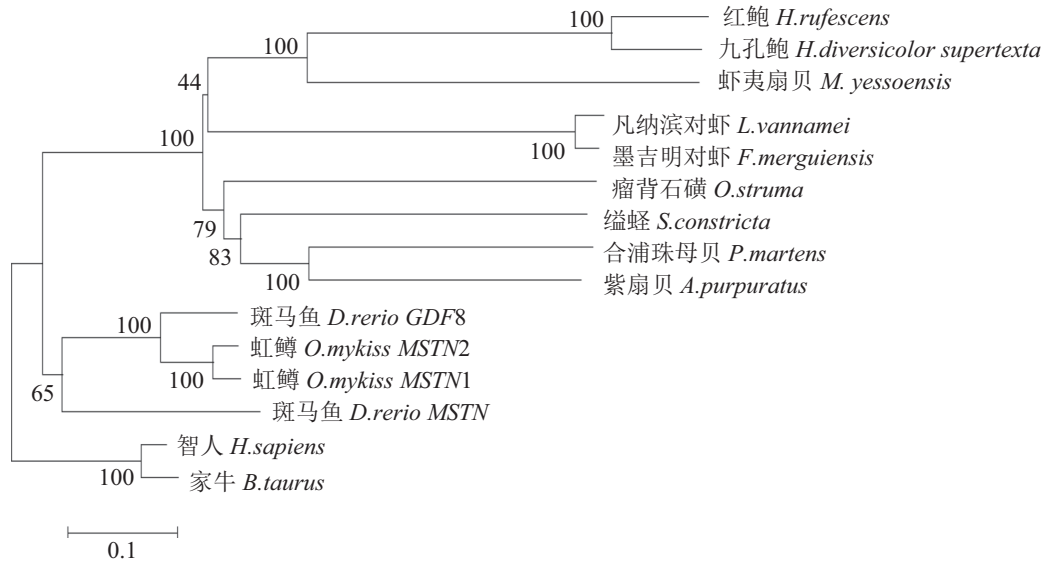


图3 基于NJ法构建MSTN氨基酸序列系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of MSTN was constructed using the Neighbor-Joining method

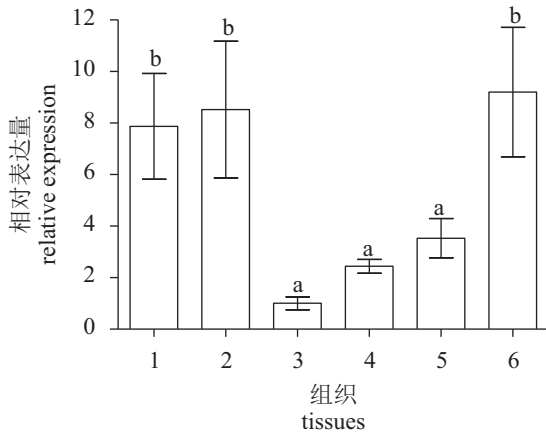


图4 九孔鲍MSTN基因组织表达情况

1.右侧壳肌; 2.外套膜; 3.性腺; 4.肝脏; 5.鳃; 6.足。不同字母表示差异显著($P<0.05$), 下同

Fig. 4 The relative expression of MSTN in different tissues

1.adductor muscle; 2. mantle; 3. gonad; 4. liver; 5. gill; 6. foot. Different letters indicate significant differences ($P<0.05$), the same below

本研究利用同源克隆的方法从九孔鲍右侧壳肌中成功获得了MSTN基因cDNA的全长, 其开放阅读框(ORF)长为1 446 bp, 编码481个氨基酸。序列分析结果显示九孔鲍MSTN氨基酸序列中具有N端信号肽、蛋白酶水解位点(RXXR)及含9个保守半胱氨酸的C端生物活性区, 符合TGF-β超家族蛋白典型结构特征。这与在小鼠^[1]、华贵栉孔扇贝^[14]等物种中的研究结果一致。C末端生物活性区在TGF-β超家族中高度保守, 半胱

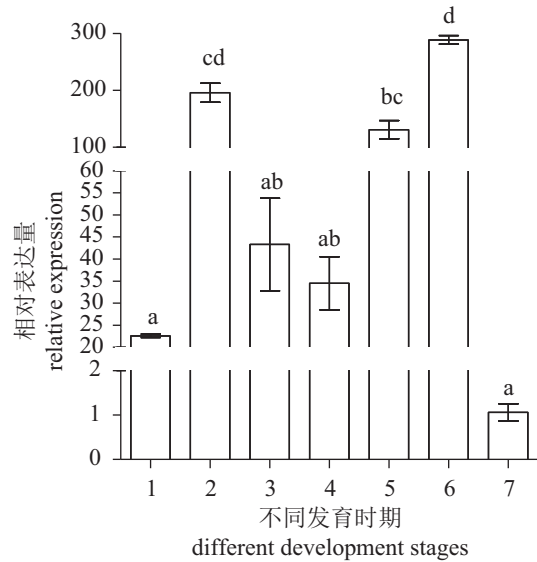


图5 九孔鲍MSTN基因不同发育时期表达情况

1.卵; 2.受精卵; 3.4细胞期; 4.8细胞期; 5.原肠胚期; 6.稚鲍; 7.幼鲍

Fig. 5 The relative expression of MSTN in different development stages

1.unfertilized egg; 2. fertilized egg; 3. 4-cell embryos; 4. 8-cell embryos; 5. gastrulae; 6. larvae; 7. juvenile

氨酸残基在MSTN蛋白的正确折叠过程中具有重要作用^[28]。多序列比对结果显示物种间MSTN氨基酸序列具有较高的保守性, 九孔鲍与红鲍的相似性最高, 为76%, 且物种间C端的蛋白酶水解位点和9个半胱氨酸残基保守, 这暗示着九孔鲍MSTN基因功能的保守。九孔鲍MSTN氨基酸

序列中除了保守的蛋白酶水解位点RRPR (364~368 aa)外, 还有2个蛋白水解位点RQRR (120~124 aa)和RYRR (235~239 aa), 且RQRR位点为九孔鲍、红鲍的共有位点。RQRR和RYRR位点可能在九孔鲍中具有某种功能, 具体功能还需进一步验证。系统进化树结果显示九孔鲍、红鲍聚为一支, 而其他贝类聚为一支, 表明九孔鲍*MSTN*基因与红鲍亲缘关系较近。

为进一步研究*MSTN*在九孔鲍中的功能, 运用qRT-PCR技术检测了其在不同组织和不同发育时期的表达情况。结果显示*MSTN*基因在九孔鲍6个组织中均有表达, 在富含肌细胞的足、右侧壳肌、外套膜中高表达, 在鳃、性腺、肝脏中低表达。研究表明, *MSTN*基因在各物种间的组织表达模式存在一定差异。在小鼠中, *MSTN*基因在骨骼肌中高表达, 在脑、肾、肠、睾丸、肝、卵巢等组织中不表达或极少量表达^[1]; 在牛中, 除骨骼肌外, 在心肌细胞中也检测到*MSTN*基因表达^[29]。鱼类*MSTN*基因在组织中的表达分布比哺乳动物广泛, 在斑马鱼的肝、心、胃、鳃、卵巢、精巢、肾、肌肉、眼和脑中均有*MSTN*基因表达^[30]; 在虹鳟体内, *MSTN*基因在肌肉、眼、脑、精巢、脾中高表达^[31]。通过基因编码技术或利用RNAi抑制*MSTN*基因表达, 可使青鳉^[4]、斑马鱼^[6]的肌肉增生或肥大, 表明*MSTN*基因在鱼类中具有抑制肌细胞增殖的功能。在海湾扇贝体内, *MSTN*基因在闭壳肌中高表达, 在外套膜、鳃、肝脏中均有表达^[19]; 在缢蛏体内, *MSTN*基因在足中高表达, 在外套膜、鳃、肝脏、性腺中较高表达^[16]。九孔鲍*MSTN*基因在富含肌细胞的组织中高表达, 与其他贝类、鱼类和哺乳动物相似, 表明该基因可能在九孔鲍肌肉生长中具有重要作用。在不同发育时期, 九孔鲍*MSTN*基因在检测的7个发育时期均表达, 在受精卵、原肠胚和稚鲍时期高表达, 在幼鲍时期表达量最低。*MSTN*基因在物种早期发育中呈现出多样的表达模式。在小鼠中, 胚胎发育到9.5 d后, 在肌节中检测到*MSTN*基因表达^[1]; 在斑马鱼中, *MSTN*基因在受精卵及受精后的发育时期均有较高表达^[32]; 在海参中, *MSTN*基因在卵、受精卵、囊胚期低表达, 原肠胚期、桶形幼虫和幼参时期高表达^[12]; 在栉孔扇贝中, *MSTN*基因在受精卵、囊胚期、面盘幼虫时期低表达, 原肠胚期高表达^[33]; 在缢蛏中, *MSTN*基

因在担轮幼虫时期高表达, 在稚贝中低表达^[16]。物种间这种复杂的表达模式暗示了*MSTN*基因在胚胎发育过程中具有重要作用。九孔鲍*MSTN*基因在原肠胚期、稚鲍时期高表达, 暗示该基因在九孔鲍早期肌肉发育中具有重要作用。此外, *MSTN*基因在幼鲍时期表达量最低, 可能是幼鲍时期具备了成鲍的形态, 个体发育变缓, 肌肉细胞生长不明显。

本研究成功克隆出*MSTN*基因cDNA全长, 利用生物信息学方法分析了该基因的序列特征, 并运用qRT-PCR技术分析了其在不同组织和不同发育时期的表达模式。研究结果表明*MSTN*基因可能在九孔鲍肌肉生长中具有重要作用, 为今后贝类遗传育种提供参考资料。

参考文献:

- [1] McPherron A C, Lawler A M, Lee S. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member[J]. *Nature*, 1997, 387(6628): 83-90.
- [2] Gao F, Sun B X, Xing S Y, *et al.* The effect of leader peptide mutations on the biological function of bovine *myostatin* gene[J]. *Gene*, 2014, 540(2): 171-177.
- [3] Kambadur R, Sharma M, Smith T P L, *et al.* Mutations in *myostatin* (*GDF8*) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle[J]. *Genome Research*, 1997, 7(9): 910-915.
- [4] Chiang Y A, Kinoshita M, Maekawa S, *et al.* TALENs-mediated gene disruption of *myostatin* produces a larger phenotype of medaka with an apparently compromised immune system[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 48: 212-220.
- [5] Lee C Y, Hu S Y, Gong H Y, *et al.* Suppression of *myostatin* with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 387(4): 766-771.
- [6] Acosta J, Carpio Y, Borroto I, *et al.* *Myostatin* gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype[J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 119(4): 324-331.
- [7] Gonzalez-Cadavid N F, Taylor W E, Yarasheski K, *et al.* Organization of the human *myostatin* gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(25):

- 14938-14943.
- [8] Hill E W, Gu J J, Eivers S S, *et al.* A sequence polymorphism in *MSTN* predicts sprinting ability and racing stamina in thoroughbred horses[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8645.
- [9] 张猛, 陈勇, 沈玉帮, 等. 草鱼 *MSTN-1* 基因多态性及与早期生长性状和肌肉成分关联分析[J]. *水产学报*, 2016, 40(4): 618-625.
- Zhang M, Chen Y, Shen Y B, *et al.* Polymorphism of *MSTN-1* and the association with growth traits and muscle compositions of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(4): 618-625(in Chinese).
- [10] Gabillard J C, Biga P R, Rescan P Y, *et al.* Revisiting the paradigm of *myostatin* in vertebrates: insights from fishes[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 194: 45-54.
- [11] Zhuo R Q, Zhou T T, Yang S P, *et al.* Characterization of a molt-related myostatin gene (*FmMstn*) from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2017, 248: 55-68.
- [12] Li S L, Zhou Z C, Dong Y, *et al.* Molecular characterization, expression analysis of the myostatin gene and its association with growth traits in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 201: 12-20.
- [13] Kim H W, Mykles D L, Goetz F W, *et al.* Characterization of a myostatin-like gene from the bay scallop, *Argopecten irradians*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 2004, 1679(2): 174-179.
- [14] Fan S G, Xu Y H, Liu B S, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of the myostatin gene and its association with growth traits in Noble scallop (*Chlamys nobilis*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 212: 24-31.
- [15] Li Q, Li Y G, Huang X D, *et al.* Molecular cloning and single nucleotide polymorphisms identification of myostatin cDNA in the pearl oyster, *Pinctada fucata*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2014, 45(6): 638-651.
- [16] Niu D H, Wang L, Bai Z Y, *et al.* Identification and expression characterization of the *myostatin (MSTN)* gene and association analysis with growth traits in the razor clam *Sinonovacula constricta*[J]. *Gene*, 2015, 555(2): 297-304.
- [17] Shin S, Song Y, Ahn J, *et al.* A novel mechanism of myostatin regulation by its alternative splicing variant during myogenesis in avian species[J]. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 2015, 309(10): C650-C659.
- [18] Morelos R M, Ramírez J L, García-Gasca A, *et al.* Expression of the *myostatin* gene in the adductor muscle of the Pacific lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus* in association with growth and environmental conditions[J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 2015, 323(4): 239-255.
- [19] Guo L, Li L, Zhang S D, *et al.* Molecular cloning and characterization of the myostatin gene in a cultivated variety of bay scallop, *Argopecten irradians*[J]. *Aquaculture*, 2012, 350-353: 192-199.
- [20] Wang X L, Meng X Y, Song B, *et al.* SNPs in the myostatin gene of the mollusk *Chlamys farreri*: association with growth traits[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 155(3): 327-330.
- [21] Fu Q, Guo H H, Feng L Y, *et al.* Association of myostatin variants with growth traits of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*)[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2016, 15(1): 145-151.
- [22] 高绪生, 王琦, 王仁波, 等. 鲍鱼[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2000.
- Gao X S, Wang Q, Wang R B, *et al.* Abalone[M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 2000 (in Chinese).
- [23] Cai J P, Han Y, Wang Z. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from abalone (*Haliotis diversicolor supertexta* L.) postlarvae associated with mass mortalities[J]. *Aquaculture*, 2006, 257(1-4): 161-166.
- [24] You W W, Ke C H, Luo X, *et al.* Growth and survival of three small abalone *Haliotis diversicolor* populations and their reciprocal crosses[J]. *Aquaculture Research*, 2009, 40(13): 1474-1480.
- [25] Liu J Y, Lai Z F, Fu X L, *et al.* Genetic parameters and selection responses for growth and survival of the small

- abalone *Haliotis diversicolor* after four generations of successive selection[J]. *Aquaculture*, 2015, 436: 58-64.
- [26] Ren P, Peng W Z, You W W, *et al.* Genetic mapping and quantitative trait loci analysis of growth-related traits in the small abalone *Haliotis diversicolor* using restriction-site-associated DNA sequencing[J]. *Aquaculture*, 2016, 454: 163-170.
- [27] Kingsley D M. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms[J]. *Genes & Development*, 1994, 8(2): 133-146.
- [28] Rodgers B D, Garikipati D K. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review[J]. *Endocrine Reviews*, 2008, 29(5): 513-534.
- [29] Sharma M, Kambadur R, Matthews K G, *et al.* Myostatin, a transforming growth factor- β superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 1999, 180(1): 1-9.
- [30] Amali A A, Lin C F, 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*, 2004, 229(4): 847-856.
- [31] Garikipati D K, Gahr S A, Rodgers B D. Identification, characterization, and quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and myostatin-1b genes[J]. *Journal of Endocrinology*, 2006, 190(3): 879-888.
- [32] Vianello S, Brazzoduro L, Dalla Valle L, *et al.* Myostatin expression during development and chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Journal of Endocrinology*, 2003, 176(1): 47-59.
- [33] Hu X L, Guo H H, He Y, *et al.* Molecular characterization of *myostatin* gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri* (Jones et Preston 1904)[J]. *Genes & Genetic Systems*, 2010, 85(3): 207-218.

Molecular cloning and expression analysis of the *MSTN* cDNA in *Haliotis diversicolor supertexta*

AI Jialin, LI Zhimin*, LIU Jianyong

(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Myostatin is an important member of the transforming growth factor (TGF) family that functions to regulate muscle development and growth in animals. The purpose of this study was to characterize and predict function of the myostatin gene of *Haliotis diversicolor supertexta* which is an important aquaculture shellfish. In this study, the myostatin (*Hs-MSTN*) cDNA of *H. diversicolor supertexta* were cloned and characterized by rapid amplification cDNA ends (RACE) methods. The full length of *Hs-MSTN* cDNA sequence consists of 3 755 bp containing a 5' untranslated region (UTR) of 324 bp, a 3' UTR of 1 985 bp, and an open reading frame of 1 446 bp encoding a protein with 481 amino acid residues, with a calculated molecular mass of 54.96 ku, and the theoretical isoelectric point of 9.41. The structure of *Hd-MSTN* included a putative signal peptide (1–17 aa), a *TGF- β* propeptide domain (157–367 aa) and a conserved *TGF- β* domain (379–481 aa). Multiple sequence alignment results revealed conservation of the RRPR proteolytic site and nine conserved cysteines of the *Hs-MSTN* with *MSTN* from other animals, and two propeptide proteolytic sites RQRR (120–124 aa) and RYRR (235–239 aa) were found. Phylogenetic analysis showed that the *Hs-MSTN* gene was clustered in the same subgroup with the *H. rufescens*. Quantitative real-time PCR detection results indicated that the *Hs-MSTN* genes were expressed widely in adductor muscle, mantle, gonad, liver, gill, foot and the highest expression level was observed in the adductor muscle, mantle, foot, and *Hs-MSTN* transcript was widely detected in early developmental stages: unfertilized egg, fertilized egg, 4-cell embryos, 8-cell embryos, gastrulae, larvae, juvenile stage, and the higher in fertilized egg, in 4-cell embryos and 8-cell embryos and the expression level increases in gastrulae, larvae and decreases in juvenile stage. Our results indicate that *MSTN* is involved in muscle growth regulation of *H. diversicolor supertexta*.

Key words: *Haliotis diversicolor supertexta*; myostatin; gene cloning; gene expression

Corresponding author: LI Zhimin. E-mail: lizhimin811@163.com

Funding projects: Development Special Fund of Shenzhen Dapeng New District (KY20170211)