

研究报告

Research Report

斑鳊 myostatin 基因及其启动子的克隆与序列分析

孙科军^{1,2} 刘希良² 王开卓² 陈敦学² 褚武英² 陈韬¹ 张建社² 成嘉^{2*}

1 湖南农业大学动物医学院,长沙,410128; 2 长沙学院生物工程与环境科学系,长沙,410003

* 通讯作者,chengjia119911@126.com

摘要 采用 Tail-PCR 和常规 PCR 技术首次克隆出斑鳊 myostatin 基因及其启动子序列。经生物信息学分析发现,斑鳊 myostatin 基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成,编码区 1 131 bp,共编码 376 个氨基酸。斑鳊 myostatin 启动子区域大小为 840 bp,存在 1 个 TATAA-box、4 个 E-box 和 1 个 CAAT-box 作用元件。利用软件 CLUSTALW 和 MEGA3.1 构建 14 种硬骨鱼的 myostatin 启动子的系统进化树结果表明,斑鳊同大口黑鲈亲缘关系最近,与鲤鱼和缨野鲮亲缘关系较远,其结果与传统形态学分类中的亲缘关系一致。斑鳊 myostatin 基因及其启动子克隆与特征分析,将为进一步研究鱼类 myostatin 基因的表达调控及其功能分析提供参考。

关键词 斑鳊,肌肉生长抑制素,启动子,序列分析

Cloning and Sequence Analysis of the Myostatin Gene and its Promoter in Golden Mandarin Fish (*Siniperca scherzeri*)

Sun Kejun^{1,2} Liu Xiliang² Wang Kaizhuo² Chen Dunxue² Chu Wuying² Chen Tao¹ Zhang Jianshe² Cheng Jia^{2*}

1 Veterinary Faculty, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128; 2 Department of Bioengineering and Environment Science, Changsha University, Changsha, 410003

* Corresponding author, chengjia119911@126.com

DOI: 10.3969/gab.031.000133

Abstract The sequences of myostatin gene and its promoter in Golden Mandarin Fish (*Siniperca scherzeri*), for the first time, were cloned through the conventional PCR and Tail-PCR technology. Bioinformatics analysis shows that the myostatin gene consists of three exons and two introns and the coding region is 1 131 bp encoding 376 amino acid residues. The nucleotide sequence analysis shows that myostatin promoter is 840 bp and contains several regulatory elements, such as one TATAA-box, four E-boxes and one CAAT-box. The phylogenetic tree of the myostatin gene promoters from 14 teleost species was constructed with CLUSTALW and MEGA3.1. The result indicates that Golden Mandarin Fish (*Siniperca scherzeri*) has a closer phylogenetic relationship with Largemouth bass (*Micropterus salmoides*), but it is far from *Cyprinus carpio* and *Labeo fimbriatus*. This result is consistent with general morphological taxonomy. This study would contribute to the further research on the regulation of myostatin expression and the function of myostatin in teleost fish.

Keywords Golden Mandarin Fish (*Siniperca scherzeri*), Myostatin, Promoter, Tail-PCR

肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)基因是 McPherron 和 Lee (1997)在研究 TGF- β (transforming growth factor- β)家族时,用该家族基因保守序列设计简并性引物对小鼠 cDNA 文库进行扩增得到的一个新基因。编码 376 个氨基酸,具有 TGF- β 超家族的典型结构,但与其它 TGF- β 家族成员的同源性很低,因而被归

为新一类 GDF-8 (Mcpherron et al., 1997)。Myostatin 基因主要在动物骨骼肌中特异性表达并对肌肉的生长发育起到负调控作用(Ríos et al., 2004)。超量表达可以导致动物肌肉萎缩,而其突变则使动物产生双肌现象(Mcpherron et al., 1997; Schuelke et al., 2004)。实验发现,将重组人 myostatin 蛋白载体肌注于裸鼠

后腿,可致肌肉和脂肪显著减少(Zimmers et al., 2002)。而敲除 myostatin 基因的小鼠肌肉质量会显著增加(Welle et al., 2007)。定向敲除 myostatin 基因可明显抑制由糖皮质激素诱发的肌肉萎缩(Gonzalez-Cadavid et al., 1998)。由近来的研究可知,与 myostatin 基因编码区相比,myostatin 基因的启动子区域序列不同物种间差异较高,意味着 myostatin 基因的转录调控模式在不同物种间可能存在着差异(Gu et al., 2004; Du et al., 2005; Yu et al., 2005)。有少数研究对人、鼠和牛等 myostatin 基因启动子进行了探讨,发现一些转录因子(如 MyoD, Smad, FoxO 和 MEF-2)对 myostatin 基因的转录和表达起到调控作用(Ma et al., 2001; Spiller et al., 2002; Crisa et al., 2003; Salerno et al., 2004; Forbes et al., 2006; Allen and Unterman, 2007)然而,这方面仍有许多未知领域有待进一步研究。

目前已有较多鱼类的 myostatin 的研究,比如:采用 RNAi 途径,给斑马鱼(*Danio rerio*)受精卵注射 myostatin 的 C 末端 dsRNA,导致斑马鱼早期胚胎的增生或肥大(Acosta et al., 2005);斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)经外源糖皮质激素处理 12 h 后,myostatin 的表达下降(Rodgers et al., 2003);虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) myostatin 前体蛋白在生长激素处理后升高(Weber et al., 2005);转 GH (生长激素)基因大麻哈鱼(*Salmo salar*)白肌组织也具有较高的 myostatin 前体水平(Biga et al., 2004)。Myostatin 是一种肌肉生长的负性调控因子,对该基因进行遗传改造,在渔业方面有着广阔的商业前景。斑鳅俗称花桂或黑桂,隶属于鲈形目(Perciformes)、鳅亚科(Siniperlinae)、鳅属(*Siniperca*),是我国著名的淡水经济鱼类,其肉质鲜美,口感细腻,富含不饱和脂肪酸,有“淡水石斑”之称(符贵红等, 2008)。与翘嘴鳅和大眼鳅等常见的鳅鱼养殖品种相比,斑鳅虽生长周期较长,但粗蛋白含量高,脂肪和灰分较低,整体营养价值和肉质品质较高,且疾病少、抗病能力强,具有较大的经济价值和应用前景(苏胜齐等, 2005)。本研究通过对斑鳅 myostatin 启动子编码区和非编码区的克隆及其结构特征的初步分析,为进一步研究斑鳅肌肉生长和发育调控奠定基础。

1 结果与分析

1.1 斑鳅 myostatin 结构基因和启动子序列片段 PCR 扩增

以斑鳅白肌基因组 DNA 为模板,分别经三轮

Tail-PCR 和两组常规 PCR 反应来克隆 myostatin 的启动子和 myostatin 的结构基因片段。PCR 产物经 1% 的琼脂凝胶电泳检测,最终得到的一个约 1 kb 大小的上游调控序列及两条分别约为 2 kb 和 1 kb 的结构基因片段(图 1)。

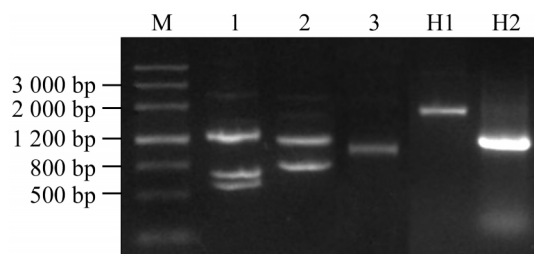


图 1 斑鳅 myostatin 基因和启动子 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳注: M: DNA Marker (天根公司); 1: 第一轮反应结果; 2: 第二轮反应结果; 3: 第三轮反应结果; H1: F1 和 R1 为引物的 PCR 反应结果; H2: F2 和 R2 为引物的 PCR 反应结果

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of the PCR product of myostatin structural gene and promoter from Golden Mandarin Fish (*Siniperca scherzeri*)

Note: M: DNA Marker (TIANGEN); 1: The first amplification product; 2: The second amplification product; 3: The third amplification product; H1: The PCR product of F1 and R1; H2: The PCR product of F2 and R2

1.2 PCR 产物测序

将 PCR 产物纯化回收、测序,然后将 3 个片段的测序结果进行拼接,得到一个 3 228 bp 的片段,其中上游调控序列长 868 bp,结构基因长 2 360 bp,结构基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成,外显子大小依次为 379 bp、371 bp 和 381 bp;内含子大小分别为 395 bp 和 830 bp。外显子总长为 1 131 bp,共编码 376 个氨基酸(图 2)。氨基酸序列分析表明,编码的氨基酸分子量大小为 42.55 kD,等电点 pI 为 5.55,氨基酸整体偏酸性。

1.3 启动子序列系统进化分析

从 Genebank 中查询得到大口黑鲈、斑马鱼、虹鳟鱼、大黄鱼、花鲈、黄鳍棘鲷、鲤鱼、缨野鲮、尖吻鲈、尼罗尖吻鲈、大鳞大麻哈鱼、金头鲷和比氏骨鲷共 13 种鱼的 myostatin 的启动子序列,与本实验克隆出来的斑鳅 myostatin 启动子进行比对。随后利用 CLUSTALW 和 MEGA3.1 软件 N-J 法构件系统发育树,bootstrap 自举值取 1 000 次,显示不同种属鱼类的进化及亲缘关系。

由图 3 可知,斑鳅、大口黑鲈、大黄鱼、花鲈、黄

1 TTGCCACACGATGGCACTATCTTCTCATGTGCTGCAACCAGGTTTCAGCAACAAGGATTT
E-box4
61 GGACTAAGCATTTCCTTTATCTTTGCTGACTTTTTTTAATTTTTTATTCTGTACGGGA
121 GACGATGTATTACCGTTTGTGGTTTTACATGAGCCGATAATCAGCTTCTCAGAAGGGAAC
I-box
181 CTGGTCTAAACAGACGACACCTAGAGAAGGACTTGACTTGCCTGGAGAAAAGTAACT
241 CTTATTTTCTCAAGGATGAAATGTATTTGCACAACCAGGCAGACA CAGCTGCATCCATG
E-box3
301 TCCCTGTCATTAAGACAATTAATGTTTGACGGACTTATCGTGCCCGCAGTTAAAAAGTT
361 TCCTTTGTTTTCTTTGAAAATAATGTATTACAGCACAACTGCACACGAAGTCGCAC
421 ATCTTGCTGTCTTTCATGATATGCAGCAGGCTCTGTAGCCTAAGCTGTTTGTGTTAGT
481 TTTGATCTGGGCTGATTGAGGTGCATCAGGGCGTTCCATATAACACAACAGTCCGGTCTG
541 CGCCCCCTCCCCTCACTGCGCAGTCACTGCAAGAAAAGTGAATTTATC CATCTGTGGACA
E-box2
601 CGTTCCG CACATGCTCACAGTCTCCGTCCTTTATGGTTTGACAACGAAAAAAGTTTTTC
E-box1
661 ATGTCAGTCGGTAAAATTCATTGTTGCCTGTCCAGC CAATCATAGTTTTTGACGACACA
CAAT-box
721 AAAGAGGCTAAAGTTGGAGTATAAAAAGGTGTGCGCTAATAAAGTATGATGCCTATCAGT
TATA box
781 GTGGGACATTAATCCAAACCCAGTCCAGTCGCCTATCAGGTCCAGCACACACCAAGGGAT
841 CTTTTTGTAACCTCACACCTTAGAGACAATGCATCTCTCAGATTGTGCTGTATCTTAG
1 M H L S Q I V L Y L S
901 CTTGCTGCTTGCTTTGGGTCCAGTAGTTTTGAGTGACCAAGAGACGCACCAGCAGCCCTC
12 L L L A L G P V V L S D Q E T H Q Q P S
961 CGCCACCAGCCAGAAGACACGGAGCAGTGCACCCTGCGAGGTCCGGCAGCAGATTA
32 A T S P E D T E Q C A T C E V R Q Q I K
1 021 AACTATGCGATTAACGCGATAAAAATCTCAGATTTTGAGCAAAGTGCGAATGAAAGAAGC
52 T M R L N A I K S Q I L S K L R M K E A
1 081 TCCTAATATCAGCCGAGATATAGTGAAGCAGTCCCTGCCAAAGCGCCGCCGCTGCAGCA
72 P N I S R D I V K Q L L P K A P P L Q Q
1 141 GCTTCTCGACCAGTACGACGTGCTGGGAGATGACAACAAGGATGTGGCTATGGAGGAGGA
92 L L D Q Y D V L G D D N K D V A M E E D
1 201 CGATGAGCATGCCATCACGGAGACAATAATGATGATGGCCACTGAACGTAAGTTTTTAAT
112 D E H A I T E T I M M M A T E
1 261 TTCGCATTGTTTTGGCATGATGAAAAGGACGTGCTCAGGCGTCTCCACAATAGGGGTTT
1 321 TACGCACGGGGCAGAACGCACGGGAGACGCTGTCCACAAGCTTTATTGACAACACGTA
1 381 CTTTACCGGGTTTTTGACATTGGAAATGTATCGATGTACCAACATTAACACGATTCAGAA
1 441 CACTATACGGGTCGGTGCATTTGCCAGTCAAGCAGCAGCGCGGTCATTACGCGCACGGACTG
1 501 TTTTCTAAACTTTATTAGTCCACTTCCAGAGATCAAATGTCGTGTCAGGGATGTTGTTT
1 561 ACACCAGTTTATTTCTGTCTGTAAATTTCAATCGCACATGGTCAGTATATAGAGAACCTT
1 621 TGCTTCTCTGTCTCTCCAGCCGAGTCCATCGTCCAGGTGGATGGGGAACCAAAGTGC
127 P E S I V Q V D G E P K C
1 681 TGCTTTTTCTCTTTAATCAAAAGTTTCAAGCCAATCGCATACTCCGGGCTCAGCTCTGG
140 C F F S F N Q K F Q A N R I L R A Q L W
1 741 GTGTATCTGCGCCCGCGCCGAGGCGACCACCGTGTTCCTGCAAATCTCCCGCTGATG
160 V Y L R P A A E A T T V F L Q I S R L M
1 801 CCGGTCACAGACGGGAACAGGCACATACGCATCCGCTCCCTGAAGATCGACGTGAATGCT
180 P V T D G N R H I R I R S L K I D V N A
1 861 GGGGCCGGCTCTTGCAAAGTATAGACGTCAAACAAGTGTGACTGTGTGGCTGCGGCAG
200 G A G S W Q S I D V K Q V L T V W L R Q
1 921 CCGGAGACCAACTGGGGCATCGAGATTAACGCCTTCGATTTCGAGTGGAAATGACTTGGCC
220 P E T N W G I E I N A F D S S G N D L A
1 981 GTGACCTCCGCAGAGCCTGGAGAGGACGGACTGTTGAGCTGAACCTTTATTTACTACTAA
240 V T S A E P G E D G L
2 041 GCCTAAACTTTATGGTCAAGTTTTTTTTACTATAAGTGATAACTAACAGTTTATTTTCATC
2 101 AATAAACGTACAGGAGTGAATAGTGTGGTGGCATGTGTGCAGAGCTATTTACTGCAGCA
2 161 TCTGGAATTTGACCATTACTACTATAGATTACAATAATTGGACCATCCGTGAAGAAACAA

2 221 AAAC TATT TCTT ATATG TCCAG TTTCTA ATTAG GTTCCAAAA GCATG TTGGA ATCTTTA
 2 281 TTGCA CTGTC CTGAG GTTTAA CTTTGGG CTTTATTG TGCAG GGAGG CTTTGC ATAGTCA
 2 341 GCAGG GGGTTAA ACATTCT CCGCATT TCACTG CTGGA AGAGG GAATCA AGATT TAAAG ACCT
 2 401 TTGAA AGTTG TTAATCA ACACAG ACTCCAT GTATGC ACACAC CCGCATT TGGACA AATGC
 2 461 CCGGTCC ACAATAA CCTCAA ATCTTATT GCTTG ATTACATA AAAAG TTCACCT GCCCCACA
 2 521 TTCCTG TGTG ACTGTG CAAATC AGAGTA ATTGCCT GCAGG CACACAC ACTGCT ACTATCA
 2 581 ATGACAA ACACCTT ATCATA CCGGCT CAAATA CTGGC ACCGGG CTCTG AGGCA ATTATAA
 2 641 CCTAGAC GGCCTG TGGATA ACCAAC CGTCATA TGATT TAAAT TCTTTAAA ACTCAA AGTTT
 2 701 CATAAT ATTTAT CGTGCC ATGTTT GAAAACC AGCTGCC AAAAGG TCGAG GGCACCGG ATTAA
 2 761 AAGATG TAACCC GAATGCT GTCATC CCGCCT CTTT TGC AAAGC AGCTAT TTTCAA AGTAT
 2 821 TCACAC ATGCTCT GTCA TGCAG CAACC ATTCA TGGAG GTGAAG ATCTC AGAGG GCCCCA
 251 Q P F M E V K I S E G P
 2 881 AGCGCG CCAGAAG AGACTCG GGCCTGG ACTGTG ACGAGA ACTCTCC AGAGTCCC GGTGCT
 263 K R A R R D S G L D C D E N S P E S R C
 2 941 GCCGCT ATCTG CTCAC AGTGG ACTTTGA AGACTT TGGCTGG GACTGG ATTATTGCC CCAA
 283 C R Y L L T V D F E D F G W I I A P
 3 001 AGCGCT ACAAGG CCAACT ATTGCT CCGGGG AGTGTG AGTACAT GCACTT ACAGAAGT ACC
 303 K R Y K A N Y C S G E C E Y M H L Q K Y
 3 061 CGCACAC CCACCT GGTGA ACAAGG CCAACCC CAGAGG GACCGC AGGCCCT GCTGTACCC
 323 P H T H L V N K A N P R G T A G P C C T
 3 121 CCACCA AGATG TCGCC CATCAAC ATGCTCT ACTTTA ACCGAAA AGAGC AGATCATCT ATG
 343 P T K M S P I N M L Y F N R K E Q I I Y
 3 181 GCAAGAT CCCTTCC ATGGTGG TGGACC GTTGTGG ATGCTCT TGAGTTG
 363 G K I P S M V V D R C G C S | *

□ E-box, I-box, CAAT box或TATA box; 黑体部分: 核心启动区
 E-box, I-box, CAAT box or TATA box; Boldface: core region of promoter
 — 起始密码 ~~~ 内含子 = 蛋白酶水解位点
 Initiation codon Intron The conservatively hydrolytic site
 * 终止密码 □ 保守的半胱氨酸残基
 Termination codon The conservative cysteine residues
 ⇨ C端生物活性区 □ 信号肽
 The bioactive carboxy terminal region The signal peptide

图2 斑鳅肌肉生长抑制素结构基因及上游调控序列分析

Figure 2 Sequence analysis of myostatin structural gene and the 5' flanking region from Golden Mandarin Fish (*Siniperca scherzeri*)

鳍棘鲷、尖吻鲈、尼罗尖吻鲈、金头鲷和比氏骨鳊这几种鲈形目鲈亚目鱼类在一个大的分支上,斑鳅与大口黑鲈的亲缘性最近,属于鲤形目鲤科的鲤鱼、缨野鲮、比氏骨鳊以及属于鲑形目鲑科的虹鳟鱼、大麻哈鱼分别在另两个大的分支上。图3 myostatin 启动子进化树所表明的鱼类亲缘关系及其本身的分类地位,与传统形态学分类结果相一致。

2 讨论

Tail-PCR 是一种用来克隆已知序列两端的未知序列的新方法,特异性高,重复性好,能快速获得目标片段。避免了基因组步行法对高质量基因组DNA的要求,与普通PCR一样,可以使用低质量的基因组DNA做模板。本试验利用Tail-PCR的方法克隆出斑鳅 myostatin 的上游调控序列,长度约为860 bp。PLACE 预测结果显示,该基因的上游调控区除含有一个核心启动序列(732~781 bp)外,还有

I-box (156~160 bp)、TATAA box (730~744 bp)、CAAT-box (698~701 bp)及4个E-box (26~31 bp, 287~292 bp, 589~594 bp, 608~613 bp)等启动子特征性调控元件的存在。进一步分析表明,斑鳅 E-box3 是 MyoD 转录因子结合位点,MyoD 可通过与 E-box 结合调控其下游靶基因 myostatin 的转录和表达,对肌肉的生长发育有着重要的调控作用(Langley et al., 2002; Østbye et al., 2007)。作为 MyoD 家族转录因子结合位点的 E-box 元件同样在斑马鱼(Xu et al., 2003)、石斑鱼(Chen et al., 2007)、虹鳟(Garikipati et al., 2006)、花鲈(Ye et al., 2007)和大西洋鲑(Østbye et al., 2007)等硬骨鱼的 myostatin 启动子序列中被发现。调控序列中的 CAAT-box 元件可极大提高基本启动子的转录效率(孙晓红等, 2002),对 myostatin 基因的转录水平也有着较大的影响。

对 myostatin 启动子的进化分析表明,斑鳅 myostatin 启动子与其它13种鱼亲缘关系的远近和本身

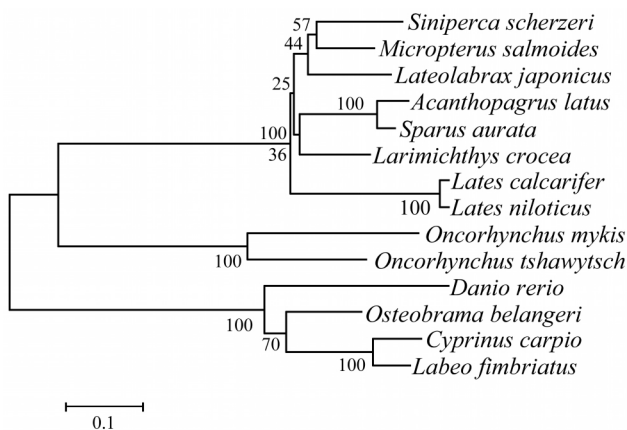


图 3 14 种鱼类 myostatin 启动子序列的 NJ 系统进化树

注: 大口黑鲈: EF071854; 斑马鱼: AY323521; 虹鳉鱼: DQ138300; 大黄鱼: AY842934; 花鲈: AY965685; 鲤鱼: GU014395; 纓野鲮: HQ850576; 尖吻鲈: EF672685; 尼罗尖吻鲈: EF681885; 金头鲷: EU881511; 黄鳍棘鲷: HM368446; 比氏骨鲷: HQ850577; 大鳞大麻哈鱼: EU009954

Figure 3 The NJ phylogenetic tree of the myostatin promoter sequences from 14 kinds of fishes

Note: *Micropterus salmoides*: EF071854; *Danio rerio*: AY323521; *Oncorhynchus mykiss*: DQ138300; *Larimichthys crocea*: AY842934; *Lateolabrax japonicus*: AY965685; *Cyprinus carpio*: GU014395; *Labeo fimbriatus*: HQ850576; *Lates calcarifer*: EF672685; *Lates niloticus*: EF681885; *Sparus aurata*: EU881511; *Acanthopagrus latus*: HM368446; *Osteobrama belangeri*: HQ850577; *Oncorhynchus tshawytscha*: EU009954

的分类学地位与传统形态学分类结果相一致。由此我们可以假设, 启动子的变化与物种的进化有着相关性, 启动子通过碱基变化来改变结构基因的转录水平从而促使物种向着与启动子作用相关的方向进化。

DNA 序列分析表明, 克隆得到的斑鳊 myostatin 结构基因长 2 360 bp, 由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 外显子大小依次为 379 bp、371 bp 和 381 bp; 内含子 1 和内含子 2 大小分别为 395 bp 和 830 bp。两个内含子都以 GT 开始, AG 结尾, 符合内含子的 GT-AG 剪接规则。进一步分析发现: 内含子 1

序列中有 2 个 CAAT-box, 内含子 2 序列中有 1 个 TATAA-box、5 个 CAAT-box 等类似启动子调控元件, 推测斑鳊 myostatin 基因内含子可能具有增强该基因转录的功能。同样, 典型的调控元件 CArG 和 TATAA-box 序列也分别在鲮 β -actin 基因内含子 1 和准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因的第 1 个内含子中被发现, 预示着这些内含子可能作为相应基因启动子的一部分在起始转录表达中有着重要作用(张殿昌等, 2007; 胡文革等, 2010)。

斑鳊 myostatin 基因推导的氨基酸序列显示: 该蛋白在 22~23 位氨基酸之间存在一个信号肽切割位点, 264~267 位氨基酸处有 RARR (与 RXXR 相一致) 蛋白酶解的加工位点。与其它 TGF- β 超家族成员蛋白一样, myostatin 蛋白以前体形式存在, 切除信号肽后, 在 RXXR 位点经蛋白酶水解加工, 形成 N 端编码前肽和 C 端生物活性区 (Lee and McPherron, 2001)。斑鳊 myostatin 氨基酸序列 C 端生物活性区的保守性很高, 其中有 9 个异常保守的半胱氨酸, 它们以二硫键形式连接形成的“cysteine knot”结构可能与 myostatin 蛋白及其它 TGF- β 超家族成员共有的蛋白稳定性及高导热性直接相关 (Muller et al., 2002; Barth et al., 2003)。

与哺乳动物相比, 虹鳉鱼、大西洋鲑鱼、罗非鱼和石鲈鱼等硬骨鱼类的 myostatin 基因有两种类型 (即 myostatin-1 和 myostatin-2) (Østbye et al., 2001; Rodgers et al., 2003; Garikipati et al., 2007)。本实验克隆的 myostatin 基因与这些鱼类的 myostatin-

同源性较高, 而斑鳊中是否有第二种 myostatin 基因类型的存在还有待进一步研究。许多研究表明: myostatin 基因是哺乳动物肌肉发育中重要的负性调控因子, 仅在骨骼肌中特异性表达; 而鱼类的 myostatin 基因在除骨骼肌外的多种组织 (如: 脑, 心, 肾, 眼, 肠等) 中广泛表达, 因此, 可推测鱼类 myostatin 基因的作用可能不仅仅局限于抑制其肌肉的生长发育, 还可对鱼类神经系统的发育等多方面产生广泛影响 (Garikipati et al., 2007)。本研究对斑鳊 myostatin 基因及启动子进行了克隆及初步的生物信息学分析, 为进一步研究斑鳊 myostatin 基因的功能及其启动子的调节机制提供了有益的参考。

3 材料与方法

3.1 试验材料和试剂

鲜活斑鳊 (*Siniperca scherzeri*) 购于长沙西长街特种水产品市场, 解剖获取鱼背部肌肉, 提取基因组 DNA 用于 myostatin 的克隆。

OMEGA Mini Plasmid Kit、Gel Extraction Kit、TaKaRa *Taq*TM PCR 试剂盒 (购自宝生物有限公司); DNA Mark、PMD18-T 载体、top10 感受态细胞 (购自天根生化科技有限公司)。

3.2 白肌基因组 DNA 的提取

称取 0.2 g 斑鳊的白肌, 尽量剪碎, 加入 1 mL 裂

解液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 100 mmol/L EDTA; 400 mmol/L NaCl; 1% SDS) 于玻璃匀浆器中研磨均匀。吸取 500 μ L 匀浆液,加入半粒黄豆大的蛋白酶 K, 摇匀, 56 $^{\circ}$ C 消化 2~3 h。裂解物分别用等体积的饱和酚、酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿/异戊醇(24:1)各抽提 1 次, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和两倍体积的无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min, 12 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清。70%乙醇漂洗两次, 离心, 弃废液, 干燥。最后用 100 μ L 无菌去离子水溶解。

3.3 引物设计和合成

根据 Genbank 中与斑鳊亲缘性较近物种的 myostatin 基因序列的比较, 设计简并引物 AD1 和特异性引物 Sp1、Sp2 及 Sp3 扩增斑鳊 myostatin 的启动子。引物 F1 和 R1, F2 和 R2 用于扩增 MSTN 基因的部分序列, 再拼接成一个长片段。所用的引物(表 1)均由博尚生物公司合成。

3.4 myostatin 基因和启动子的克隆

AD1 为 14 bp 的简并引物, 以斑鳊白肌基因组 DNA 为模板与下游引物 SP1 进行第一轮扩增, 然后以 1 μ L 第一轮产物为模板与下游引物 SP2 进行第二轮扩增, 最后以 1 μ L 第二轮产物继续与下游引物 SP3 进行第三轮扩增, 得到第三轮产物(PCR 程序如表 2)。以斑鳊基因组 DNA 为模板, F1 和 R1 为引物进行扩增, 程序为 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 36 个循环, 72 $^{\circ}$ C 8 min。以 F2 和 R2 为引

表 1 引物序列及退火温度

Table 1 Nucleotide sequences and annealing temperature of oligonucleotide primers

引物 Primer	引物序列(5'-3') Nucleotides sequence (5'-3')	退火温度($^{\circ}$ C) Annealing temperature ($^{\circ}$ C)
AD1	CGATGGCRCYRTCN	42
SP1	CATTATTGTCTCCGTGATGGCA	60
SP2	CTGGTGGTCTCTTTGGTCAC	58
SP3	GTTTGGATTAATGTCCACAC	58
F1	AGACAATGCATCTCTCTCAGAT	56
R1	CTTCACCTCCATGAATGGTTG	56
F2	ACTGGGGCATCGAGATTAACG	58
R2	CAACTCAAGAGCATCCACAACG	58

物, 斑鳊基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 程序为 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 36 个循环, 72 $^{\circ}$ C 8 min。

3.5 PCR 产物的回收和测序

以上 PCR 产物经 1% 的琼脂胶电泳分离, 切下目的条带, 用 OMEGA Gel Extraction Kit 试剂盒回收。纯化产物连接至 PGM-18T 载体, 转化到 top10 感受态细胞中, 菌落 PCR 筛选阳性克隆, 提取质粒, 送博尚生物公司测序。

3.6 序列的生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件进行核苷酸及氨基酸序列分析, 由 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/sign>)

表 2 Tail-PCR 反应程序

Table 2 Procedure of Tail-PCR

反应 Reaction	程序号 File No.	循环数 Cycle No.	反应条件 Thermal condition
第一轮 1 st amplification	1	1	92 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min
	2	5	94 $^{\circ}$ C 30 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 s
	3	1	94 $^{\circ}$ C 30 s; 28 $^{\circ}$ C 2 min, ramping to 72 $^{\circ}$ C 0.3 $^{\circ}$ C/s; 72 $^{\circ}$ C 2 min
	4	10	94 $^{\circ}$ C 30 s; 42 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 s
	5	1	94 $^{\circ}$ C 30 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 s
	6	14	94 $^{\circ}$ C 30 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 s 94 $^{\circ}$ C 30 s; 42 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 s
第二轮 2 nd amplification	7	1	72 $^{\circ}$ C 5 min
	1	1	92 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min
	8	15	94 $^{\circ}$ C 30 s; 58 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 s 94 $^{\circ}$ C 30 s; 58 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 s 94 $^{\circ}$ C 30 s; 58 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 s
第三轮 3 rd amplification	7	1	72 $^{\circ}$ C 5 min
			同第二轮 The same as secondary

alscan.html)预测启动子调控元件及转录起始位点。Splig (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi>)进行内含子分析。

作者贡献

孙科军是本研究的试验执行者,完成了采样、基因克隆、数据分析以及论文初稿的撰写与修改;刘希良、王开卓和陈敦学参与了试验的采样和数据分析工作;陈韬和张建社为本研究立意指导;成嘉和褚武英参与本研究的实验设计和论文修改。

致谢

感谢孙志良教授的精心指导和大力支持。

参考文献

- Acosta J., Carpio Y., Borroto I., Gonzalez O., and Estrada M.P., 2005, Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype, *J. Biotechnol.*, 199119(4): 324-331
- Allen D.L., and Unterman T.G., 2007, Regulation of myostatin expression and myoblast by FoxO and SMAD transcription factors, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 292(1): C188-C199
- Barth D., Kyrieleis O., Frank S., Renner C., and Moroder L., 2003, The role of cysteine knots in collagen folding and stability, part . Conformational properties of (Pro-Hyp-Gly) model trimers with N-and C-terminal collagen type cysteine knots, *Chemistry*, 9(15): 3703-3714
- Biga P.R., Schelling G.T., Hardy R.W., Cain K.D., Overturf K., and Ott T.L., 2004, Growth hormone differentially regulates muscle myostatin-1 and-2 and increases circulating cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Gen. Comp. Endocrin.*, 135(3) 324-333
- Chen Y.M., Wei C.Y., Chien C.H., Chang H.W., Huang S.I., Yang H.L., and Chen T.Y., 2007, Myostatin gene organization and nodavirus-influenced expression in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*), *Comp. Biochem. Physiol., Part D*, 2(3): 215-227
- Crisa A., Marchitelli C., Savarese M.C., and Valentini A., 2003, Sequence analysis of myostatin promoter in cattle, *Cytogenet Genome Res.*, 102(1-4): 48-52
- Du R., Chen Y.F., An X.R., Yang X.Y., Ma Y., Zhang L., Yuan X.L., Chen L.M., and Qin J., 2005, Cloning and sequence analysis of myostatin promoter in sheep, *DNA Seq.*, 16(6): 412-417
- Forbes D., Jackman M., Bishop A., Thomas M., Kambadur R., and Sharma M., 2006, Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism, *J. Cell Physiol.*, 206(1): 264-272
- Fu G.H., Chu W.Y., Cheng J., Liu F., Liu Z., and Zhang J.S., 2008, Analysis on nutritional components in muscle of *Siniperca kneri* and *Siniperca scherzeri*, *Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agricultural Sciences)*, 36(34): 10522-10523, 15026 (符贵红, 褚武英, 成嘉, 刘芳, 刘臻, 张建社, 2008, 大眼鳊和斑鳊肌肉营养成分分析, *安徽农业科学*, 36(34): 10522-10523, 15026)
- Garikipati D.K., Gahr S.A., and Rodgers B.D., 2006, Identification, characterization, and quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and myostatin-1b genes, *Journal of Endocrinology*, 190(3): 879-888
- Garikipati D.K., Gahr S.A., Roalson E.H., and Rodgers B.D., 2007, Characterization of rainbow trout myostatin-2 genes (rtMSTN-2a and -2b): Genomic organization, differential expression, and pseudogenization, *Endocrinology*, 148(5): 2106-2115
- Gonzalez-Cadavid N.F., Taylor W.E., Yarasheski K., Sinha-Hikim I., Ma K., Ezzat S., Shen K.Q., Lalani R., Asa S., Mamitam M., Nair G., Arver S., and Bhasin S., 1998, Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95(25): 14938-14943
- Gu Z., Zhang Y., Shi P., Zhang Y.P., Zhu D., and Li H., 2004, Comparison of avian myostatin genes, *Anim. Genet.*, 35(6): 470-472
- Hu W.G., Chen C.F., Wang Y.Z., Hao F.X., Cao X.D., and Sheng J.L., 2010, Cloning and sequence analysis of the β -actin gene promoter region of *Leuciscus merzbacheri*, *Dongwuxue Zazhi (Chinese Journal of Zoology)*, 45(1): 18-26 (胡文革, 陈创夫, 王远志, 郝凤霞, 曹旭东, 盛金良, 2010, 准噶尔雅罗鱼 β -肌动蛋白基因启动子克隆及序列分析, *动物学杂志*, 45(1): 18-26)
- Langley B., Thomas M., Bishop A., Sharma M., Gilmour S., and Kambadur R., 2002, Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression, *J. Biol. Chem.*, 277: 49831-49840
- Lee S.J., and McPherron A.C., 2001, Regulation of myostatin activity and muscle growth, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 98(16): 9306-9311
- Ma K., Mallidis C., Artaza J., Taylor W., Gonzalez-Cadavid N., and Bhasin S., 2001, Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene regulation by dexamethasone *in vitro*, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 281(6): E1128-E1136
- McPherron A.C., Lawler A.M., and Lee S.J., 1997, Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member, *Nature*, 387(6628): 83-90
- McPherron A.C., and Lee S.J., 1997, Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene, *Proc. Natl. Acad.*

- Sci., USA, 94(23): 12457-12461
- Muller Y.A., Heiring C., Misselwitz R., Welfle K., and Welfle H., 2002, The cystine knot promotes folding and not thermodynamic stability in vascular endothelial growth factor, *J. Biol. Chem.*, 277(45): 43410-43416
- Østbye T.K., Galloway T.F., Nielsen C., Gabestad I., Bardal T., and Andersen Ø., 2001, The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues, *Eur. J. Biochem.*, 268 (20): 5249-5257
- Østbye T.K., Wetten O.F., Tooming-Klunderud A., Jakobsen K.S., Yafe A., Etzioni S., Moen T., and Andersen Ø., 2007, Myostatin (MSTN) gene duplication in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Evidence for different selective pressure on teleost myostatin-1 and-2, *Gene*, 403(1-2): 159-169
- Ríos R., Fernández-Nocelos S., Carneiro I., Arace V.M., and Dev-ersa J., 2004, Differential response to exogenous and endogenous myostatin in myoblasts suggests myostatin acts as an autocrine factor *in vivo*, *Endocrinology*, 145(6): 2795-2803
- Rodgers B.D., Weber G.M., Kelley K.M., and Levine M.A., 2003, Prolonged fasting and cortisol reduce myostatin mRNA levels in tilapia larvae; short-term fasting elevates, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 284(5): R1277-R1286
- Salerno M.S., Thomas M., Forbes D., Watson T., Kambadur R., and Sharma M., 2004, Molecular analysis of fiber type-specific expression of murine myostatin promoter, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 287(4): C1031-1040
- Schuelke M., Wagner K.R., Stolz L.E., Hübner C., Riebel T., Kömen W., Braun T., Tobin J.F., and Lee J., 2004, Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child, *N. Engl. J. Med.*, 350(26): 2682-2688
- Spiller M.P., Kambadur R., Jeanplong F., Thomas M., Martyn J. K., Bass J.J., and Sharma M., 2002, The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD, *Mol. Cell Biol.*, 22(20): 7066-7082
- Su S.Q., Zhang H.Q., He Z.Y., and Zhang Z.X., 2005, A comparative study of the nutrients and amino acid composition of the muscle of *Siniperca chuatsi* and *S. scherzeri*, *Xinan Nongye Daxue Xuebao (Ziran Kexue Ban) (Journal of South-west Agricultural University (Natural Science))*, (6): 898-901 (苏胜齐, 张海琪, 何中央, 张祖兴, 2005, 翘嘴鳊和斑鳊肌肉营养成分及氨基酸组成比较, *西南农业大学学报(自然科学版)*, (6): 898-901)
- Sun X.H., Li M.J., and Pan Y.J., 2002, A brief account of promoter cloning, *Shijun Xuebao (Acta Edulis Fungi)*, 9(3): 57-62 (孙晓红, 李明杰, 潘迎捷, 2002, 启动子克隆概述, *食用菌学报*, 9(3): 57-62)
- Weber T.E., Small B.C., and Bosworth B.G., 2005, Lipopolysaccharide regulates myostatin and MyoD independently of an increase in plasma cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *Domestic Animal Endocrinology*, 28(1): 64-73
- Welle S., Bhatt K., Pinkert C.A., Tawil R., and Thornton C.A., 2007, Muscle growth after post-developmental myostatin gene knockout, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 292(4): E985-E991
- Xu C., Wu G., Zohar Y., and Du S.J., 2003, Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish, *J. Exp. Biol.*, 206: 4067-4079
- Ye H.Q., Chen S.L., Sha Z.X., and Liu Y., 2007, Molecular cloning and expression analysis of the myostatin gene in sea perch (*Lateolabrax japonicus*), *Mar. Biotechnol. (NY)*, 9(2): 262-272
- Yu Z.Q., Meng Q.Y., Yuan L., Zhao Z.H., Li W., Hu X.X., Yan B.X., Fan B.L., Yu S.Y., and Li N., 2005, Comparative analysis of the pig BAC sequence involved in the regulation of myostatin gene, *Science in China Series C, Life Sciences*, 48 (2): 168-180
- Zhang D.C., Shao Y.Q., Su T.F., and Jiang S.G., 2007, Analysis of genomic structure and promoter characterization of mud carp (*Cirrhinus molitorella*) β -actin gene, *Zhongguo Shuichan Kexue (Journal of Fishery Sciences of China)*, 14(3): 345-351 (张殿昌, 邵艳卿, 苏天凤, 江世贵, 2007, 鲮 β -肌动蛋白基因和启动子的克隆及序列特征分析, *中国水产科学*, 14 (3): 345-351)
- Zimmers T.A., Davies M.V., Koniari L.G., Haynes P., Esquela A.F., Tomkinson K.V., Mcpherrom K.A., Wolfman N.M., and Lee S.J., 2002, Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin, *Science*, 296(5572): 1486-1488