

## 黄河裸裂尻鱼肌肉生长抑制素基因克隆及表达分析

晁 燕<sup>1</sup>, 赵兰英<sup>1</sup>, 李长忠<sup>2</sup>, 谢保胜<sup>2</sup>, 申志新<sup>3</sup>, 王国杰<sup>3</sup>, 王振刚<sup>3</sup>, 李 超<sup>1</sup>, 拜彬强<sup>1</sup>,  
张 辉<sup>1,\*</sup>, 祁得林<sup>1,\*</sup>

(1. 青海大学 农牧学院动物科学系, 西宁 810016; 2. 青海大学 生物科学系, 西宁 810016;

3. 青海省渔业环境监测站, 青海省高原水生生物及生态环境重点实验室, 西宁 810012)

**摘要:** 肌肉生长抑制素 (myostatin, MSTN) 属于转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ )超家族中的一个成员, 是骨骼肌生长发育的负调控因子。该文以黄河裸裂尻鱼肌肉总 RNA 为模板, 采用 RT-PCT、5'-RACE 和 3'-RACE 法获得 MSTN 基因全长 cDNA 序列为 2 180 bp, 包含长为 1 128 bp 的开放阅读框, 编码 375 个氨基酸。以肌肉总 DNA 为模板, 通过 PCR 法进一步获得了 MSTN 基因的 2 个内含子序列, 分析表明, 黄河裸裂尻鱼 MSTN 基因与其他脊椎动物具有相似的基因结构(包括 3 个外显子和 2 个内含子)。黄河裸裂尻鱼 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 RXXR 和 8 个位于 TGF- $\beta$  功能区域保守的半胱氨酸残基。氨基酸序列同源性分析表明, 黄河裸裂尻鱼 MSTN 序列与其他鲤科鱼类 MSTN 具有较高的同源性; 而与哺乳动物和禽类的 MSTN 同源性较低。系统发育分析表明, 黄河裸裂尻鱼 MSTN 与其他鲤科鱼类聚于同一进化支。RT-PCR 分析表明, 该基因在黄河裸裂尻鱼 9 个被检组织中均有表达, 但在心、肾、肠、精巢中表达量较高。Real-Time PCR 分析显示, MSTN 基因在胚胎中的相对表达量, 随胚胎发育阶段的不同而有所差异, 暗示 MSTN 的功能可能并不局限在对肌肉生长发育的负调控作用, 可能还有其他功能。

**关键词:** 黄河裸裂尻鱼; 肌肉生长抑制素; 基因克隆; 表达

**中图分类号:** Q959.468; Q344.13; Q786      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0254-5853-(2012)05-0473-08

## cDNA cloning and expression analysis of *MSTN* gene from *Schizopygopsis pylzovi*

CHAO Yan<sup>1</sup>, ZHAO Lan-Ying<sup>1</sup>, LI Chang-Zhong<sup>2</sup>, XIE Bao-Sheng<sup>2</sup>, SHEN Zhi-Xin<sup>3</sup>,  
WANG Guo-Jie<sup>3</sup>, WANG Zhen-Gang<sup>3</sup>, LI Chao<sup>1</sup>, BAI Bin-Qiang<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>1,\*</sup>, QI De-Lin<sup>1,\*</sup>

(1. Animal Science Department of Agriculture and Animal Husbandry College, Qinghai University, Xining 810016, China; 2. Department of Biological Sciences, Qinghai University, Xining 810016, China; 3. Key Laboratory for Plateau Aquatic Organism and Environment of Qinghai Province, Fishery Environmental Monitoring Station of Qinghai Province, Xining 810012, China)

**Abstract:** Myostatin (MSTN) is a member of the TGF- $\beta$  superfamily that acts as a negative regulator of skeletal muscle growth. A full-length, 2180 bp, cDNA sequence of the myostatin gene from *Schizopygopsis pylzovi* was cloned with RT-PCR, 5'-RACE and 3'-RACE and the cDNA clone included a 1128 bp ORF, encoding a 375 amino acid peptide. Using PCR, we obtained the sequences of two introns of the *MSTN* gene and found that its structure in *Schizopygopsis pylzovi* was similar to that of other vertebrates, including three exons and two introns. Likewise, the putative MSTN peptide of *Schizopygopsis pylzovi* contains a conserved RXXR proteolytic cleavage domain, and 8 conserved cysteine residues in the C terminal of the protein, similar to other vertebrates. Phylogenetic analysis showed that the MSTN of *Schizopygopsis pylzovi* has high homology with other cyprinid fishes, but a low homology with mammals and birds. In the 9 examined tissues, the *MSTN* gene was highly expressed in heart, kidney, intestine and spermary, while weakly expressed in muscle, brain, fat, gill and hepatopancreas. Quantitative real-time PCR analysis showed that the expression of *MSTN* gene was different during embryo development, suggesting that the fish MSTN may not only play roles in muscle development but also contribute to other biological functions.

收稿日期: 2012-05-21; 接受日期: 2012-09-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(30860048, 31160226); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-09-0861)

\*通信作者(Corresponding author), 祁得林, 博士, 教授, 研究方向为动物分子遗传与生态学, E-mail: delinqi@126.com; 张辉, 硕士, 教授, 研究方向为动物营养学, E-mail: pzhyp@sina.com

第一作者简介: 晁燕(1974-), 在职硕士研究生, 研究方向为动物遗传繁育学, E-mail: chaoyanqh@126.com

**Key words:** *Schizopygopsis pylzovi*; Myostatin; Gene cloning; Expression

黄河裸裂尻鱼(*Schizopygopsis pylzovi*)隶属鲤形目(Cypriniformes)鲤科(Cyprinidae)裂腹鱼亚科(Schizothoracinae), 广泛分布于青藏高原东北部兰州以上黄河干支流、湖泊、沼泽、柴达木水系以及湟水河水系中(Wu & Wu, 1991)。栖息于水质清澈、水流缓慢、水底多砾石的水域, 通常以浮游动植物或底栖动植物为食料, 在青藏高原淡水生态系统的食物链中具有重要的地位。同其他裂腹鱼亚科鱼类一样, 黄河裸裂尻鱼具有生长期短、生长缓慢、性成熟迟以及繁殖力低等典型生物学特性, 加之受人类活动和环境恶化的影响, 近年来黄河裸裂尻鱼种群数量锐减, 栖息水域明显萎缩(Qi et al, 2007)。目前对黄河裸裂尻鱼的研究主要集中在形态分类、生物学特性、遗传多样性、系统发育和人工繁殖等方面(Wu, 1984; Wu & Wu, 1991; Qi et al, 2007, 2008, 2009, 2012), 而对其功能基因方面的研究仍为匮乏。

肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN), 又称GDF-8(growth differentiation factor 8), 是McPherron et al(1997)在小鼠中发现的特异性骨骼肌生长发育负调控因子, 属于转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )超家族成员之一。MSTN 同TGF- $\beta$ 超家族的其他成员一样, 转录产物先翻译合成前体蛋白, 其中包括N-末端的前肽区、C-末端的成熟肽区和信号肽区等3部分, 在N-末端和C-末端之间有一个蛋白酶解加工位点(RXXR)。成熟肽在被切割后可负向调节肌肉的生长发育, MSTN 前肽在骨骼肌中可与MSTN 成熟肽结合, 抑制MSTN 成熟肽的活性, 促进肌肉的生长。MSTN 基因过度表达, 将通过下调 MyoD、Myogenin mRNA 水平和下游的肌酸激酶的活性, 可逆的抑制生肌的过程; 降低MSTN 的表达水平, 可以提高 MyoD 家族成员和肌肉肌酸激酶的转录, 从而促进生肌过程(Rios & Cmneiro, 2002)。Reisz-Porszasz et al (2003)的研究证实, MSTN 过表达的转基因鼠肌肉量和心肌重量降低、肌纤维数量和肌核数量减少, 而MSTN 基因敲除小鼠骨骼肌比正常野生型小鼠增加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, 其胸肌约为野生型小鼠的 262%(Patel & Amthor, 2005)。在斑马鱼中, 通过RNAi途径, 给斑马鱼受精卵注射MSTN C-端 dsRNA, 导致斑马鱼早期胚

胎的增生或肥大(Acosta et al, 2005), 由此可见, MSTN 对鱼类肌肉细胞的生长、发育也有着重要的调控作用。

鉴于MSTN基因对动物肌肉生长发育的调控作用及其潜在应用价值, 以及黄河裸裂尻鱼的研究现状, 本文对黄河裸裂尻鱼MSTN基因特征、结构、组织表达特异性及其在胚胎发育中的相对表达水平进行了初步研究, 旨在为黄河裸裂尻鱼的繁育工作积累科学数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 样本采集 黄河裸裂尻鱼采集于青海省苏只黄河鱼类增殖站, 用于MSTN基因克隆和组织半定量RT-PCR检测。黄河裸裂尻鱼受精卵在水温8.6~14.5℃, 溶氧7.8~8.4 mg/L的条件下, 经11 d人工孵化后大量破膜, 积温为158.2℃·d。根据胚胎发育特征采集卵裂期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、器官形成期、尾芽期、肌肉效应器、心跳期以及孵化期等主要发育时期的受精卵, 用于检测胚胎不同发育期的MSTN基因的表达水平。

1.1.2 试剂 RNAiso Plus、PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、5'-Full RACE Kit、3'-Full RACE Core Set Ver.2.0、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0、pMD19-T Vector、*E. coli* Competent Cells JM109、Premix Ex Taq® Version 2.0、PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time)、SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)为宝生物工程(大连)有限公司产品, 其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 MSTN基因cDNA序列扩增 利用RNAiso Plus 提取组织总RNA。cDNA 第一链的合成使用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒, 以黄河裸裂尻鱼肌肉总RNA为模板, Oligo dT为反转录引物, 按试剂盒推荐方法进行操作。根据GenBank登录的斑马鱼(*Danio rerio*, AY323521)、鲤(*Cyprinus carpio*, GQ214770)和南亚野鲮(*Labeo rohita*, GQ332409)的MSTN基因序列设计一对引物MSTNF和MSTNR(表1), 用于扩增MSTN cDNA核心片段。以肌肉cDNA为模板利用Premix Ex Taq®

Version 2.0 试剂盒进行 PCR 扩增。PCR 扩增程序: 94 ℃ 预变性 3 min; 98 ℃ 变性 10 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 35 循环; 最后一循环 72 ℃ 续延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳后, 用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 产物回收试剂盒进行回收纯化, 然后克隆至 pMD19-T 载体中, 转化感受态 *E. coli* Competent Cells JM109, PCR 检测阳性克隆后送生工(上海)生物有限公司进行测序。

根据克隆得到的黄河裸裂尻鱼肌肉 *MSTN* cDNA 核心片段及试剂盒要求分别设计 5'-RACE 嵌套引物 *MSTN5A1* 和 *MSTN5A1*, 以及 3'-RACE 嵌套引物 *MSTN3A1* 和 *MSTN3A1*(表 1)。RACE 采用 5'-Full RACE Kit 和 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0, 按其推荐方法进行, RACE 产物经纯化和克隆后进行测序。

**表 1 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因克隆及分析引物**  
**Tab. 1 Primers for *MSTN* clone and analysis in *Schizopygopsis pylzovi***

引物名称 Primer	序列(5'—3') Sequence
<i>MSTNF</i>	GGCTGGGACTGGATTATTG
<i>MSTNR</i>	CCCTCTCTGTTCTCTGGAT
<i>MSTN5A1</i>	GAGCAATAATCCAGTCCCAGCCGAA
<i>MSTN5A2</i>	TTATCTCAATGCCAGTTGGTCTCCG
<i>MSTN3A1</i>	CTGGACTTGGGAATGGACACTT
<i>MSTN3A2</i>	CCACCCCTCATTATCAGTGCTTTTC
<i>MSTNintron1F</i>	TCTCAGCAAACCTCCGACTCAAACA
<i>MSTNintron1R</i>	CCGTCCGTAAAGAGGCATCAGG
<i>MSTNintron2F</i>	AGCGACCACCGTCTTACAGATA
<i>MSTNintron2R</i>	TTTGGACCCCTCCGAGATTTCAC
<i>MSTNrealF</i>	AATAATCCAGTCCCAGCCGAAG
<i>MSTNrealR</i>	CCCGACCTCACCAAGCACAAACA
<i>GAPDH</i>	TAAGGCAGAACGGCGCAAGC
<i>GAPDHR</i>	GTGAAAACACCAAGTAGACTCCACAAACA

**1.2.2 基因组 DNA 扩增** 采用 Qi et al(2008)的方法提取黄河裸裂尻鱼肌肉组织基因组 DNA。由已发表脊椎动物 *MSTN* 基因序列推测, 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因含有 2 个内含子, 在推测的内含子位置两端分别设计特异引物 *MSTNintron1F*、*MSTNintron1R* 和 *MSTNintron2F*、*MSTNintron2R*(表 1), 以基因组 DNA 为模板扩增两个内含子, 扩增产物经纯化和克隆后进行测序。

**1.2.3 半定量 RT-PCR 检测** 黄河裸裂尻鱼心脏、肝胰脏、肾、肌肉、脑、脂肪、肠、鳃和精巢共 9

个组织总 RNA 的提取同前, 总 RNA 经 DNase I (RNase free) 处理, 平衡其起始浓度后, 分别反转录合成 cDNA 模板(方法同上)。根据拼接获得的 *MSTN* 全长 cDNA 序列, 设计半定量 RT-PCR 和 Real-Time PCR 引物(*MSTNrealF* 和 *MSTNrealR*)。用于半定量 RT-PCR 和 Real-Time PCR 的内标 *GAPDH* 基因引物为 *GAPDH*F 和 *GAPDH*R(表 1)。以各组织的反转录产物为模板, 利用 *MSTNrealF* 和 *MSTNrealR* 为引物进行扩增。PCR 反应体系为 25 μL, PCR 反应程序为: 94 ℃, 3 min; 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 30(*MSTN*)或 25(*GAPDH*)个循环后 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。

**1.2.4 Real-Time PCR 法检测胚胎不同发育期的 *MSTN* 表达水平** 根据黄河裸裂尻鱼胚胎不同发育期, 每期取样 3 份, 分别来自 3 个孵化筐。每份样品由 10 枚胚胎组成, 混合在一起提取总 RNA(方法同上), 利用 PrimeScript® RT reagent Kit 试剂盒反转录合成 cDNA 池, 依照 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒进行 Real-time PCR 分析。20 μL 反应体系中包括: SYBR® Premix Ex Taq™ 10 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL、cDNA 模板 2.0 μL、ddH<sub>2</sub>O 7.2 μL。Real-time PCR 时, 每份样品重复 3 次, 结果采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析。

**1.2.5 数据分析** 采用 Lasergene 7.0(Burland, 2000)软件对所克隆的基因序列进行阅读框分析、氨基酸序列推定; Blastx 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行蛋白质相似性搜索; DNAMAN Version 6.0(<http://www.lynnnon.com>)进行氨基酸序列同源性比较; ExPASy - Tools (<http://www.expasy.ch/tools/>) 对 *MSTN* 蛋白的生化特性和蛋白质功能位点进行预测和分析; Signal P 4.0 server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽分析; MEGA3.1(Kumar et al, 2004)软件进行碱基组成和变异分析并构建邻接(Neighbor - joining, NJ)系统发育树。应用 GSDS(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>)绘制基因结构示意图并手工修改。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 全长 cDNA 及氨基酸序列分析

黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因 cDNA 全长为 2 180 bp, 其中开放阅读框(ORF)长 1 128 bp, 编码 375 个

氨基酸; 5'-端非翻译区(5'-UTR)长 76 bp, 3'-端非翻译区(3'-UTR)长 976 bp, 包括典型的多聚腺苷酸加尾信号序列(ATAAA)和 polyA 尾。信号肽预测结果显示, 在其 N 末端含有一个 22 个氨基酸组成的信号肽序列, 切割位点位于 22 位 Gly 和 23 位的 Asp 之间, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA(图 1)。

序列分析显示, 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 包含两端保守区域: TGF-β 前肽区域(41~257)和 TGF-β 功能区域(278~375)。黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 具有典型的 RXXR 蛋白酶水解位点(263~266)。全序列中有 3 个 N-酰基化位点(N-myristoylation site)、2 个 N-糖基化位点(N-glycosylation site)、6 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(casein kinase II phosphorylation site)、2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(protein kinase C phosphorylation site)和 14 个保守的半胱氨酸残基位点(16、40、43、138、139、272、281、282、309、313、339、340、372、374), 其中 5 个位于 TGF-β 前肽区域, 8 个位于 TGF-β 功能区域, 1 个位于信号肽区域(图 1)。

## 2.2 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因内含子序列与分布

将测序得到的序列在 NCBI 网站上 BLAST 确认和比对后, 确定黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因 2 个内含子序列。内含子 1 长 660 bp, 内含子 2 长 898 bp, 由此获得黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因全长为 3 738 bp (GenBank NO. JX088635)。黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因 2 个内含子将 1 128 bp 的编码序列分隔成 3 个外显子: 外显子 1 为 376 bp、外显子 2 为 370 bp、外显子 3 为 382 bp (图 2)。

## 2.3 *MSTN* 序列同源性与系统发育分析

应用 DNAMAN Version 6.0 软件, 比较黄河裸裂尻鱼与人、小鼠、猪、牦牛、鸡、草鱼、鳙鱼、鳡、厚颌鲂、稀有鮈、斑马鱼、纓野鲮、鲤、岩原鲤、虹鳟鱼和松江鲈的 *MSTN* 氨基酸同源性。结果显示, 黄河裸裂尻鱼与以上物种序列同源性分别为 64.7%、63.4%、65.0%、62.9%、64.7%、95.5%、95.8%、95.7%、96.0%、96.0%、92.6%、96.6%、96.3%、96.6%、86.7% 和 80.1%。

基于黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 氨基酸序列和 GenBank 公布的其他物种的相应序列构建了脊椎动物系统发育树(图 3)。从图中可以看出, 系统发育树将脊椎动物分成 2 个主要族群, 其中 1 个族群由人、哺乳动物和禽类组成; 另一族群由鱼类组成。黄河裸裂尻鱼与其他鲤科鱼类, 如草鱼、鳙鱼、鲤、斑马鱼、稀有鮈、岩原鲤等聚于一支, 这与基于

形态学的鱼类系统发育研究结论一致(Wu & Wu, 1991; Saitoh et al, 2006)。

## 2.4 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因的组织特异性表达

采用半定量 RT-PCR 方法, 检测了 *MSTN* 基因 mRNA 在黄河裸裂尻鱼心脏、肝胰脏、肾、肌肉、脑、脂肪、肠、鳃和精巢共 9 个组织中的表达情况(图 4)。结果发现 *MSTN* mRNA 在黄河裸裂尻鱼心、肾、肠、精巢中表达量最高, 肌肉、脑组织中的表达量次之, 脂肪和鳃中有微量表达, 肝胰脏中有极少量表达。

## 2.5 黄河裸裂尻鱼胚胎不同发育期 *MSTN* 基因的表达

以卵裂期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、器官形成期、尾芽期、肌肉效应器、心跳期、孵化期胚胎 cDNA 为模板, 通过 Real-Time PCR 分析发现, 黄河裸裂尻鱼胚胎在尾芽期 *MSTN* 表达量最高, 其次是器官形成期早期(受精后第 5 天), 而在神经胚期早期(受精后第 3 天)最低。以受精后 4 h *MSTN* 基因表达量为对照, 尾芽期、器官形成期早期(受精后第 5 天)、肌肉效应器和心跳期基因表达量分别是受精后 4 h 的 2.08、1.81、1.61 和 1.49 倍; 而神经胚期早期(受精后第 3 天)、器官形成期后期(受精后第 7 天)和孵化期表达量分别是受精后 4 h 的 0.33、0.46 和 0.66 倍, 其余各时期表达量变化不明显(图 5)。

## 3 讨 论

本文克隆获得的黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因与其他脊椎动物的 *MSTN* 具有较高的同源性, 结构分析显示克隆所得序列拥有 3 个外显子和 2 个内含子, 且外显子和内含子的剪切位点均遵循“GT…AG”法则。黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因编码 375 个氨基酸, 推导的氨基酸序列中含有 RXXR 蛋白酶水解位点, 在 C 端生物活性区含有 8 个保守的半胱氨酸残基, 并且整条多肽链包含两个典型的 TGF-β 结构域: 即 TGF-β 前肽区域(41~257)和 TGF-β 功能区域(278~375), 符合 TGF-β 超家族蛋白的特征, 与其他脊椎动物的 *MSTN* 蛋白一致(McPherron et al, 1997; Li et al, 2007; Lu et al, 2010)。基于 *MSTN* 氨基酸序列的系统发育树将脊椎动物分成 2 个主要族群, 其中由人、哺乳动物和鸡组成一个族群; 所有鱼类组成另一个族群。黄河裸裂尻鱼与其他鱼类, 如草鱼、鳙鱼、鲤、斑马鱼、稀有鮈、岩原鲤等聚于一支,

ATCTACTTGTCCGGTGCCTGGTCAAGGTTCTTCATAGCAAATCAGATCAAACATCCTTGGCACGCTTTGGAAC [76]  
 ATG CAT TTT ACA CAG GTT TTA ATT TAT CTA AGT GTA TTT ATT GCA TGC GGT TCA GTG AGT [136]  
 Met His Phe Thr Gln Val Leu Ile Tyr Leu Ser Val Phe Ile Ala Cys Gly Ser Val Ser [20]  
 Signal peptide (1-22) ▲  
 CAT GGA GAT ATA ACG GCG CAC CAG CCT TCC ACA GCC ACG GAG CAA AGC GAG CAG TGT [196]  
 His Gly Asp Ile Thr Ala His Gln Pro Ser Thr Ala Thr Glu Gln Ser Glu Gln Cys [40]  
 CK-2 (20-23) CK-2 (32-35)  
 TCC ACA TGT GAG TTC AGA CAA CAC AGC AAG CTG ATG AGA CTG CAT GCC ATC AAG TCC CAA [256]  
 Ser Thr Cys Glu Phe Arg Gln His Ser Lys Leu Met Arg Leu His Ala Ile Lys Ser Gln [60]  
 CK-2 (41-44) ▲  
 ATT CTC AGC AAA CTC CGA CTC AAA CAG GCT CCA AAT ATT AGC CGG GAC GTG GTC AAG CAG [316]  
 Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Lys Gln Ala Pro Asn Ile Ser Arg Asp Val Val Lys Gln [80]  
 N-glycosylation (72-75)  
 CTG TTA CCC AAA GCA CCG CCT TTG CAA CAA CTT CTG GAT CAG TAC GAT GTT CTG GGG GAT [376]  
 Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Gln Gln Leu Leu Asp Gln Tyr Asp Val Lys Leu Gly Asp [100]  
 GGC AGT AAG GAT GGA GCT ATG GAA GAG GAT GAA CAT GCC ACC ACC GAG ACC ATC ATG [436]  
 Gly Ser Lys Asp Gly Ala Met Glu Glu Asp Asp Glu His Ala Thr Thr Glu Thr Ile Met [120]  
 N-myristylation (101-106)  
 ACC ATG GCC ACA GAG CCT GAC CCA ATC GTT CAA GTC GAT CGG AAA CCG AAG TGT TGT TTT [496]  
 Thr Met Ala Thr Glu Pro Asp Pro Ile Val Gln Val Asp Arg Lys Pro Lys Cys Cys Phe [140]  
 CK-2 (124-127) ▲ ▲  
 TTC TCC TTC AGT CCG AAC ATT CAA GCG AAC CGG ATC GTC AAA GCG CAG CTG TGG GTT CAT [556]  
 Phe Ser Phe Ser Pro Lys Ile Gln Ala Asn Arg Ile Val Lys Ala Gln Leu Trp Val His [160]  
 PKC (144-146)  
 CTG AGA CCG GCG GAA GGA GCG ACC ACC GTC TTC TTA CAG ATA TCA CGC CTG ATG CCT CTT [616]  
 Leu Arg Pro Ala Glu Gly Ala Thr Thr Val Phe Leu Gln Ile Ser Arg Leu Met Pro Leu [180]  
 ACG GAC GGA GGA AGG CAC ATA CGA ATA CGA TCC CTG AAG ATC GAT GTG AAC GCA GGA GTG [676]  
 Thr Asp Gly Gly Arg His Ile Arg Ile Arg Ser Leu Lys Ile Asp Val Asn Ala Gly Val [200]  
 PKC (191-193)  
 ACA TCT TGG CAG AGT ATA GAC GTC AAA CAG GTG CTC GCG GTG TGG TTA AGA CAG CCG GAG [736]  
 Thr Ser Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys Gln Val Leu Ala Val Trp Leu Arg Gln Pro Glu [220]  
 ACC AAC TGG GGC ATT GAG ATA AAC GCG TAT GAC GCG AAG GGA AAC GAC TTG GCC GTC ACC [796]  
 Thr Asn Trp Gly Ile Glu Ile Asn Ala Tyr Asp Ala Lys Gly Asn Asp Leu Ala Val Thr [240]  
 N-myristylation (224-229) N-myristylation (234-239)  
 TCA GCC GAG CCT GGA GAA GAT GGA CTG CTC CCC TTC ATG GAG GTG AAA ATC TCG GAG GGT [856]  
 Ser Ala Glu Pro Gly Glu Asp Gly Leu Leu Pro Phe Met Glu Val Lys Ile Ser Glu Gly [260]  
 CK-2 (240-243)  
 CCA AAG CGA ATC CCG AGG GAC TCC GGG CTG GAC TGC GAC GAG AAT TCC TCA GAG TCT CGA [916]  
 Pro Lys Arg Ile Arg Arg Asp Ser Gly Leu Asp Cys Asp Glu Asn Ser Ser Glu Ser Arg [280]  
 RXXR CK-2 (268-271) ▲  
 TGC TGC AGG TAC CCG CTC ACT GTG GAC TTC GAG GAC TTC GGC TGG GAC TGG ATT ATT GCT [976]  
 Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Asp Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala [300]  
 ▲ ▲  
 CCA AAA CGC TAT AAG GCG AAT TAT TGT TCT GGA GAA TGC GAT TAC ATG CAC CTG CAG AAA [1036]  
 Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Asp Tyr Met His Leu Gln Lys [320]  
 ▲  
 TAT CCC CAC ACC CAT CTG GTG AAC AAG GCC AAC CCG CGA GGC ACC GCC GGG CCC TGC TGC [1096]  
 Tyr Pro His Thr His Leu Val Asn Lys Ala Asn Pro Arg Gly Thr Ala Gly Pro Cys Cys [340]  
 ▲ ▲  
 ACC CCC ACC AAG ATG TCT CCC ATC AAC ATG CTT TAC TTC AAC GGC AAA GAG CAG ATC ATC [1156]  
 Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile [360]  
 TAC GGC AAG ATC CCC TCA ATG GTA GTC GAC CGC TGT GGC TGC TCG TGA [1204]  
 Tyr Gly Lys Ile Pro Ser Met Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser \* [375]  
 ▲ ▲  
 ACCAGTCCCCAGACAGGACTCGATTGTCCTCACAGGCCGGACATCTGATCACACCACCCCACCTCCATTATCAGTGCTT [1284]  
 TCCCGAAGACACTGTGCAATAGATGGACGCTCACTCACTCTGGGCACCGCTCATATGACTATGTTTTGTCACTTT [1364]  
 CCTCTAAATCGGCATCTCTGCCACAGGAGTCAATGTTACATGGATGTTACTAAAGGAATGTTATATACAGGCTGGACTTG [1444]  
 GGAATGGACACTTTGAAATGACGACATTCTGCTTATTTCATGTTTCACTTGTCAAGAATTCTCTCATTAGGATA [1524]  
 CGCAGACAACATTGTTATTACGCAACCACCTCCAAAATACAATCATTAGATTGCTGTAACAGCCTGAGCTGTTAAAGAAG [1604]  
 GGTATCCAAGAGAAACAGAGAGGGACTCTGAAACATTGAAACAGACGCTTGAATACAGTATTGCTGCAACAGCCTACACATTG [1684]  
 CACTACAATAAACACACAGATCGAAATTGTTAATTGTTAGCTTGTCAACTACGCAATTGTCATAACAGCCTACACATTG [1764]  
 AAGTATTATTGAAATCGGCATTAGGGGACAGAAGGGACTTGAAGCAAAGGTGCTGTAATGCGGCTCTATACATTGAAATGT [1844]  
 GTTCGAGACAGAGACATCAGAACTGTAAGAATGTTAATATCACGCTAACACTCTGTTCAAACACAGCTTC [1924]  
 ACTATGGCGACCAATAGAAAAATTGGTGCTAAAATGTTGAAAAACAGATTGTTGATATGTTGCTAATTGTTATTGT [2004]  
 ATATCTGCCATTGTTCCATTAAACAGTTGCCTTTTAAACACGGCTTAGTACATGTATAGGAAACACGAAATAGCAAAA [2084]  
 AGTGTACAATATAAATTTATGTATCTGTTCAACAAATAAAGGTGCTTGTAAAAAAAAAAAAAAAA [2164]  
 AAAAAAAAAAAAAAA [2180]

图 1 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列Fig. 1 *MSTN* cDNA and deduced amino acid sequence of *Schizopygopsis pylzovi*

灰色阴影表示信号肽序列(1-22), 下划线表示蛋白水解酶位点(RXXR), ▲ 表示保守的半胱氨酸残基, \*表示终止密码子。图中缩写代表各功能域, 即 CK-2: 酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点; N-glycosylation: N-糖基化位点; N-myristylation: N-酰基化位点; PKC: , 蛋白激酶 C 磷酸化作用位点。

The signal peptide sequence is marked with shadow box (1-22). The conservatively hydrolytic site (RXXR) is underlined. Black triangles indicate the conservative cysteine residues. Asterisk indicates stop codon. The abbreviation of motifs is presented as follows: CK-2, casein kinase II phosphorylation site; N-glycosylation, N-glycosylation site; N-myristylation, N-myristylation site; PKC, protein kinase C phosphorylation site.

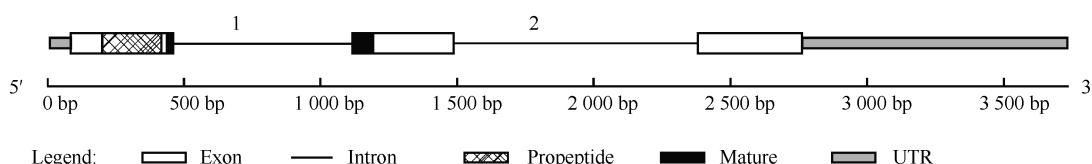


图 2 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因结构示意图  
Fig. 2 *MSTN* gene structure of *Schizopygopsis pylzovi*

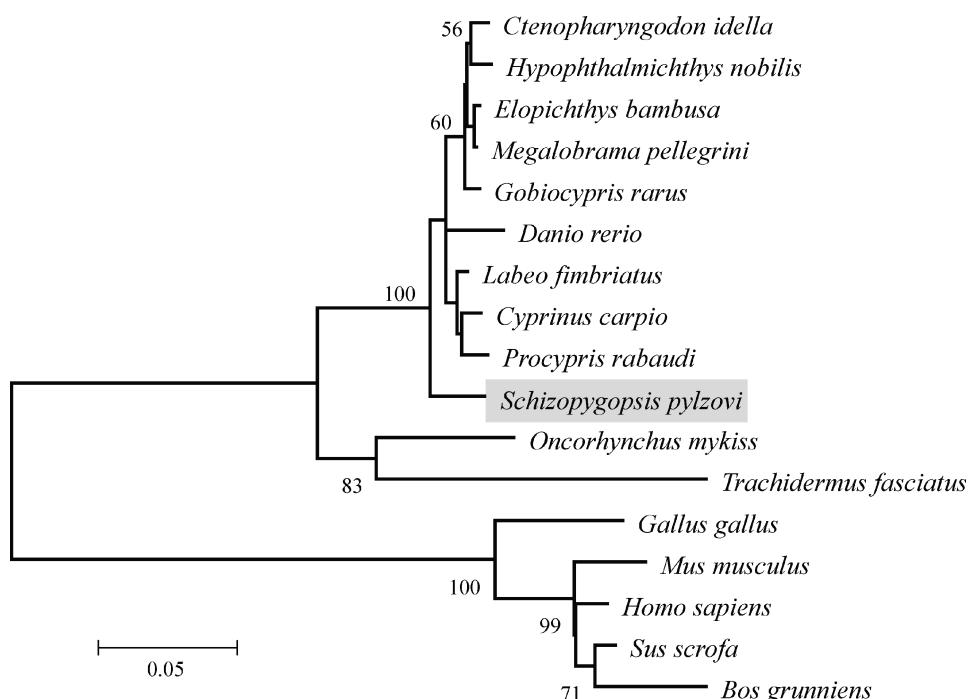


图 3 基于 *MSTN* 基因氨基酸序列构建的部分脊椎动物系统发育树  
Fig. 3 Phylogenetic tree of representative vertebrates based on *MSTN* amino acid sequences

节点上数据表示 1 000 次重复的支持率(%, 仅显示≥50%的值)。各物种 *MSTN* 序列登录号分别为: 人(ABI48422)、小鼠(NM\_010834)、猪(ABR08657)、牦牛(ABY74330)、鸡(ACY68210)、草鱼(ACB45875)、鳙鱼(AEJ83922)、鲤(ADK94456)、厚颌鲂(ADD71156)、稀有𬶋𬶋(ACK76230)、斑马鱼(AAP85526)、缨野鲮(AEN75197)、鲤(ACS92640)、岩原鲤(ADD71155)、虹鱥鱼(NP\_001117754)和松江鲈(GU198192)。

Numbers at the nodes denote the bootstrap values of 1,000 replicates (only those ≥50% are shown). GenBank accession numbers of *MSTN* sequences used are: *Homo sapiens*, ABI48422; *Mus musculus*, NM\_010834; *Sus scrofa*, ABR08657; *Bos grunniens*, ABY74330; *Gallus gallus*, ACY68210; *Ctenopharyngodon idella*, ACB45875; *Hypophthalmichthys nobilis*, AEJ83922; *Elopichthys bambusa*, ADK94456; *Megalobrama pellegrini*, ADD71156; *Gobiocypris rarus*, ACK76230; *Danio rerio*, AAP85526; *Labeo fimbriatus*, AEN75197; *Cyprinus carpio*, ACS92640; *Procypris rabaudi*, ADD71155; *Oncorhynchus mykiss*, NP\_001117754; *Trachidermus fasciatus*, GU198192.

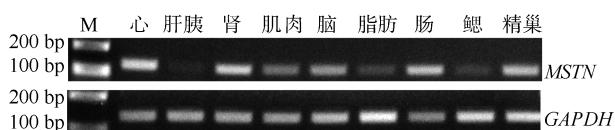


图 4 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因的半定量 RT-PCR 检测结果  
Fig. 4 Detection of *MSTN* expression in *Schizopygopsis pylzovi* by semiquantitative reverse transcription PCR  
M: 100 bp 分子量标记(100 bp molecular marker)。

这与基于形态学的鱼类系统发育研究结论一致(Wu & Wu, 1991; Saitoh et al, 2006)。

研究表明, 哺乳动物与鱼类 *MSTN* 基因的组织

表达不尽相同。在成体小鼠中, *MSTN* 基因强烈表达于骨骼肌中, 而在肺、胸腺、脑、肾、胰腺、肠、脾、睾丸、肝、卵巢等组织中不表达或只有极少量表达(McPherron et al, 1997); 在猪中除骨骼肌外, 乳腺中也有表达, 提示 *MSTN* 基因与母猪妊娠或泌乳期乳腺的生长发育有关(Ji et al, 1998); 在羊和牛中除骨骼肌外, 心脏组织中有 *MSTN* 基因的表达, 且定位在心脏的浦肯野氏纤维和心肌细胞中, 说明在羊和牛心肌发育过程, *MSTN* 也起到重要作用(Sharma et al, 1999)。鱼类 *MSTN* 在机体中的分布比哺乳动物广泛, 除了在骨骼肌表达以外, 还可以在

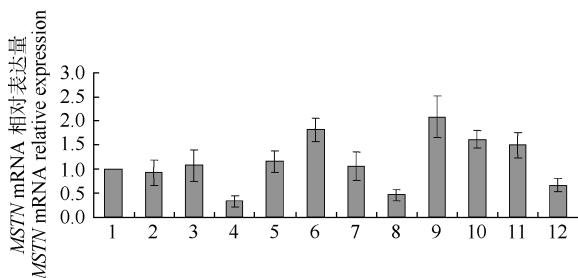


图 5 黄河裸裂尻鱼胚胎不同发育期 *MSTN* mRNA 的相对表达量

Fig. 5 Real-time PCR analysis of *MSTN* transcripts of embryos in different development stages

X 坐标中数字分别表示: 1: 卵裂期(受精后约 4 h); 2: 囊胚期(受精后第 1 天); 3: 原肠胚期(受精后第 2 天); 4-5: 神经胚期(受精后第 3-4 天); 6-8: 器官形成期(受精后第 5-7 天); 9: 尾芽期(受精后第 8 天); 10: 肌肉效应器(受精后第 9 天); 11: 心跳期(受精后第 10 天); 12: 孵化期(受精后第 11 天)。

The numbers of X-axis are presented as follows: 1, cleavage stage (about 4 hours after fertilization); 2, blastula stage (day 1 after fertilization); 3, gastrula stage (day 2 after fertilization); 4-5, neurula stage (from days 3-4 after fertilization); 6-8, organogenetic stage (from days 5-7 after fertilization); 9, tail-bud stage (day 8 after fertilization); 10, muscular contraction stage (day 9 after fertilization); 11, heartbeat stage (the day 10 after fertilization); 12, hatching stage (from day 11-12 after fertilization).

多个组织中表达, 如脑、肠、鳃、肾、眼睛、脾、心、肝、性腺等。Amali et al(2003)发现斑马鱼 *MSTN* 基因的表达不仅仅限于骨骼肌, 在所有检测的组织, 如肝、心、胃、鳃、卵巢、精巢、肾、肌肉、眼和脑中均有表达, 在大西洋鲑鱼的研究中也获得与斑马鱼基本相同的结果(Rescan et al, 2001)。普通鲤鱼 *MSTN* 基因主要在肌肉和脑部表达, 其他组织无表达(Li et al, 2007), 而鱈的 *MSTN* 基因在组织中的表达较为广泛(Yu et al, 2010)。由此可见, 即便是在硬骨鱼类中, *MSTN* 基因的表达也有所差异。本研究发

现, *MSTN* 基因在黄河裸裂尻鱼心、肾、肠、精巢、肌肉、脑、脂肪、鳃、肝胰脏组织中均有表达, 从表达特征和表达水平来看与其他硬骨鱼类一定差异, 这可能暗示黄河裸裂尻 *MSTN* 基因除对肌肉生长发育起到调控作用以外, 可能还有其他功能, 如参与代谢功能、性腺和心肌发育调控。

*MSTN* 基因在小鼠胚胎发育到 9.5 d 的 1/3 体节中开始表达, 只限于最成熟的吻端部分, 在小鼠发育到 10.5 d 时, 在所有生肌节中均可检测到 *MSTN* 基因的表达; 斑马鱼 *MSTN* 基因的表达是母源性的, 从 1 细胞就开始表达(Amali et al, 2003); Vianello et al(2003)也发现斑马鱼的 *MSTN* 转录子在 1 细胞中就出现, 受精后 8 h 降低, 在受精后 16 h, *MSTN* mRNA 水平再次增加, 显示由胚胎转录而来, 预示肌肉细胞分化的开始, 受精后 24 h, 当体节发生几乎完成的时候, *MSTN* mRNA 轻微降低; 斑点叉尾鮰 *MSTN* 基因在受精后第一天的胚胎中就开始表达(Kocabas et al, 2002), 而在牙鲆和虹鳟胚胎发育过程中并没有检测到 *MSTN* 基因的表达(Xu & Chen, 2008)。虽然本研究未检测黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 在 1 细胞期的表达情况, 但是在卵裂期已经开始表达, 并且在孵化至第 3 天时 *MSTN* mRNA 水平明显下降, 可能预示肌肉细胞分化的开始; 在器官形成期早期(受精后第 5 天)、尾芽期、肌肉效应器和心跳期 *MSTN* mRNA 水平再次增加, 表现出与斑马鱼和其他鱼类胚胎不同的 *MSTN* 基因表达特征。黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因在胚胎不同发育阶段的独特表达特征暗示, *MSTN* 的功能可能并不局限在对肌肉生长发育的负调控作用, 但是否在胚胎发育中发挥其他功能还有待进一步研究和证实。

## 参考文献:

- Acosta J, Carpio Y, Borreto I, González O, Estrada MP. 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype [J]. *J Biotechnol*, **119**(4): 324-331.
- Amali AA, Lin CJF, Chen YH, Wang WL, Gong HY, Lee CY, Ko YL, Lu JK, Her GM, Chen TT, Wu JL. 2003. Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin [J]. *Dev Dyn*, **229**(4): 847-856.
- Burland TG. 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software [J]. *Methods Mol Biol*, **132**: 71-91.
- Ji S, Losinski RL, Cornelius SG, Frank GR, Willis GM, Gerrard DE, Depreux FFS, Spurlock ME. 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal [J]. *Am J Physiol*, **275**(4 Pt 2): R1265-R1273.
- Kocabas AM, Kucuktas H, Dunham RA, Liu ZJ. 2002. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1575**(1-3): 99-107.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*, **5**(2): 150-163.
- Li XM, Fan W, Zhang B, Peng K, Wang YF, Hu W, Zhao HB. 2007. Cloning of myostatin of common carp and its expression pattern in different tissues [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2007, **31**(5): 643-648. [李兴美, 范巍, 张彬, 彭扣, 王玉凤, 胡炜, 赵浩斌. 2007. 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): 643-648.]
- Lu XY, Zhang Y, Wang XG, Zhang YP, Xu JR, Lai R, Gu ZL. 2010.

- Identification and characterization of myostatin gene in rough-skinned sculp, *trachidermus fasciatus* [J]. *Zool Res*, **31**(4): 387-394. [卢祥云, 张营, 王星果, 张燕萍, 徐建荣, 赖俊, 顾志良. 2010. 松江鲈肌肉生长抑制素基因克隆和序列特征分析. 动物学研究, **31**(4): 387-394.]
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member [J]. *Nature*, **387**(6628): 83-90.
- Patel K, Amthor H. 2005. The function of myostatin and strategies of myostatin blockade-new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle [J]. *Neuromuscul Disord*, **15**(2): 117-126.
- Qi DL, Guo SC, Zhao XQ, Yang J, Tang WJ. 2007. Genetic diversity and historical population structure of *Schizopygopsis pylzovi* (Teleostei: Cyprinidae) in the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Freshw Biol*, **52**(6): 1090-1104.
- Qi DL, Chao Y, Guo SC, Zhao XQ. 2008. Genetic structure of five Huanghe schizothoracin *Schizopygopsis pylzovi* populations based on mtDNA control region sequences [J]. *Acta Zool Sin*, **54**(6): 972-980. [祁得林, 魏燕, 郭松长, 赵新全. 2008. 黄河裸裂尻鱼五种群mtDNA控制区的遗传结构. 动物学报, **54**(6): 972-980.]
- Qi DL, Li TP, Chao Y, Yang C. 2009. Taxonomic status of *Schizopygopsis kessleri* inferred from Cyt b gene sequence [J]. *Chn J Zool*, **44**(4): 1-7. [祁得林, 李太平, 魏燕, 杨成. 2009. 利用Cyt b基因序列探讨柴达木裸裂尻鱼的分类学地位. 动物学杂志, **44**(4): 1-7.]
- Qi DL, Chao Y, Guo SC, Zhao LY, Li TP, Wei FL, Zhao XQ. 2012. Convergent, Parallel and Correlated Evolution of Trophic Morphologies in the Subfamily Schizothoracinae from the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *PLoS ONE*, **7**(3): e34070.
- Reisz-Porszasz S, Bhasin S, Artaza JN, Shen RQ, Sinha-Hikim I, Hogue A, Fielder TJ, Gonzalez-Cadavid NF. 2003. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **285**(4): 876-888.
- Rescan PY, Jutel I, Rallière C. 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *J Exp Biol*, **204**(Pt 20): 3523-3529.
- Rios R, Cameiro I, Arce VM, Devesa J. 2002. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, **282**(5): C993-C999.
- Saitoh K, Sado T, Mayden RL, Hanzawa N, Nakamura K, Nishida M, Miya M. 2006. Mitogenomic evolution and interrelationships of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): the first evidence toward resolution of higher-level relationships of the world's largest freshwater fish clade based on 59 whole mitogenome sequences [J]. *J Mol Evol*, **63**(6): 826-841.
- Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV, Fowke PJ, Bass JJ. 1999. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct [J]. *J Cell Physiol*, **180**(1): 1-9.
- Vianello S, Brazzoduro L, Valle LD, Belvedere P, Colombo L. 2003. Myostatin expression during development and chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *J Endocrinol*, **176**(1): 47-59.
- Wu YF. 1984. Systematics and taxonomy of the Schizothoracine fishes in China [J]. *Acta Biol Plat Sin*, (3): 119-139. [武云飞. 1984. 中国裂腹鱼亚科鱼类分类与系统关系研究. 高原生物学集刊, (3): 119-139.]
- Wu YF, Wu CZ. 1991. The Fishes of the Qinghai-Xizang Plateau [M]. Chengdu: Sichuan Publishing House of Science & Technology. [武云飞, 吴翠珍. 1991. 青藏高原鱼类. 成都: 四川科学技术出版社.]
- Xu JY, Chen SL. 2008. Cloning and expression analysis of the myostatin (MSTN) gene in *Paralichtys olivaceus* [J]. *J Fisher Chn*, **32**(4): 497-506. [徐建勇, 陈松林. 2008. 牙鲆肌肉生长抑制素(MSTN)基因克隆. 水产学报, **32**(4): 497-506.]
- Yu JF, Zhang Y, Wang XG, Xu JR, Lu XY, Li JL, Gu ZL. 2010. Cloning and expression analysis of the myostatin gene in *Elopichthys bambusa* [J]. *J Fisher Chn*, **34**(10): 1486-1493. [郁建峰, 张营, 王星果, 徐建荣, 卢祥云, 李建林, 顾志良. 2010. 鳕肌肉生长抑制素(MSTN)基因的克隆及其组织特异性表达分析. 水产学报, **34**(10): 1486-1493.]