

鸡、鹅肌肉生成抑制因子基因的克隆及序列分析

马现永, 施振旦, 曹永长, 毕英佐, 马静云

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术,从鸡胚、鹅胚中扩增得到肌肉生成抑制因子基因,分别克隆到 pGEM-T Easy 载体中进行序列测定. 结果表明,克隆得到的 MSTN 基因序列均由 1 128 个核苷酸组成, MSTN 基因序列同源性为 94.6%,推导相应氨基酸序列的同源性达 97.9%.

关键词:鸡; 鹅; 肌肉生成抑制因子; 基因克隆; 基因序列分析

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)02-0085-04

Cloning and sequencing analysis of myostatin gene of chicken and goose

MA Xian-yong, SHI Zhen-dan, CAO Yong-chang, BI Ying-zuo, MA Jing-yun

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The myostatin gene of chicken and goose was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR), then cloned into pGEM-T Easy vector and sequenced separately. The result showed that the complete gene either obtained from chicken or goose skeletal muscle consisted of 1 128 nucleotides, chicken myostatin cDNA sequence shared 94.6% homology with goose myostatin cDNA sequence, and the homology of myostatin amino acids sequence between them was 97.9%, which was higher than that of the cDNA sequence.

Key words: chicken; goose; myostatin; gene cloning; gene sequencing analysis

肌肉生成抑制因子(myostatin, 缩写为 MSTN)又称 GDF-8(growth differentiation factor 8),属于 TGF- β 超家族,是由 Mcpherron 等^[1]于 1997 年首次在小鼠骨骼肌中发现的,具有抑制肌肉发育的功能,该因子在小鼠胚胎生肌节区表达,成年后该基因继续表达. 肌肉生成抑制因子基因序列在不同物种间呈高度保守,尤其是 C-末端. 通过基因敲除技术使小鼠的 MSTN 基因的 C-末端缺失,其体质量比野生型的小鼠大 30%,且与年龄及性别无关,背部、臀部肌肉明显肥大^[2]. 据报道,世界闻名的 2 个双肌牛品种-比利时蓝牛(Belgian Blue)和皮德蒙特牛(Piedmontese)MSTN 基因的突变是导致双肌牛的主要原因^[3~6]. 近年来,许多学者致力于肌肉生成抑制因子的研究,目前发现的肌肉生成抑制因子基因,就 cDNA 而言,大多是由 1 128 个核苷酸组成,编码含 375 个氨基酸的多肽,在动物体内起到抑制骨骼肌生长作用的主要是末端

编码的 109 个氨基酸^[7]. 笔者采用反转录-聚合酶链反应技术分别从鸡胚、鹅胚中扩增得到 MSTN 基因,为以后对 MSTN 的研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

14 日龄鸡(黄羽肉鸡)胚、16 日龄鹅(马岗鹅)胚; TRIzol Reagent RNA 提取试剂盒购自 GibcoBRL 公司, Ex Taq 酶、dNTP 为 TaKaRa 公司产品, pGEM-T Easy 载体为 Promega 公司产品. 菌株 DH-5 α 为华南农业大学家禽实验室保存.

1.2 方法

1.2.1 肌肉组织总 RNA 的提取 按 TRIzol Reagent RNA 提取试剂盒的使用说明书,提取鸡胚、鹅胚肌肉组织中总 RNA.

1.2.2 引物的设计与合成 参照 GenBank 中鸡、鹅

的 MSTN 序列设计引物,引物序列如下:

上游引物(C1)ATGCAAAAGCTAGCAGTCTATG,

下游引物(C2)TCATGAGCACCCGCAACGAT.

引物由上海申友公司合成.

1.2.3 反转录 参照 TaKaRa 的 AMV 反转录酶使用说明进行,在 20 μ L 反应体系中分别加入 以下组分: RNA 5 μ L, 5 $\times$ buffer 4 μ L, dNTPs 3 μ L, RNA 酶抑制剂 0.5 μ L, C2 1 μ L, AMV 2 μ L, DEPC 水 4.5 μ L. 将以上成分混匀后,室温放置 5~10 min, 42 $^{\circ}$ C 保温 1 h, 冰浴 2~5 min, RT 产物直接用于 PCR 扩增或 -20 $^{\circ}$ C 保存.

1.2.4 MSTN cDNA 的 PCR 扩增 取上述反转录产物 cDNA 10 μ L, 分别加入 C1、C2 各 2 μ L, 10 $\times$ buffer 10 μ L, dNTPs 8 μ L, Ex Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, 双蒸水 67.5 μ L, 进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外灯下进行观察, 凝胶成像及分析系统 (VIL-BER LOURMAT) 记录结果.

1.2.5 基因的克隆与序列分析 纯化 PCR 产物, 加尾后与 pGEM-T Easy 载体连接, 转化到 DH-5 α 受体菌中, 对阳性菌落进行 PCR 鉴定.

小规模培养阳性菌落, 提取质粒进行酶切鉴定后, 送上海申友公司测序. 所测的 DNA 序列用 Blast 程序进行同源性检索. 根据核苷酸序列推导出氨基酸序列, 并与相关肌肉生成抑制因子 (MSTN) 的氨基酸序列进行比较.

2 结果

2.1 基因的扩增

利用设计的 1 对特异性引物, 采用反转录-聚合酶链反应技术, 从鸡胚、鹅胚中分别扩增出 1 条约 1 100 bp 左右的片段 (图 1), 与预期的扩增片段相符, 且特异性与重复性较好.

2.2 阳性克隆的鉴定

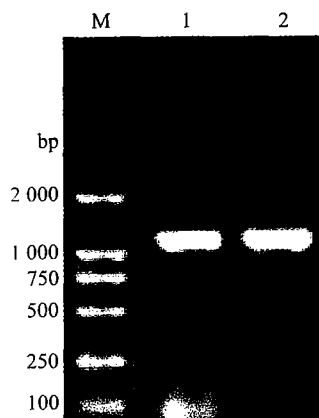
将目的基因克隆到 pGEM-T Easy 载体, 转化大肠杆菌 DH-5 α , 挑选阳性的克隆, 用 PCR 和酶切 (图 2) 进行鉴定, 结果与预期的一致, 初步确认已获得了鸡、鹅的 MSTN 基因.

2.3 目的基因的核苷酸序列测定

将上述筛选的阳性克隆送上海申友公司进行序列测定, 获得了鸡、鹅 MSTN 基因的核苷酸序列, 见图 3.

序列测定结果表明, 克隆的鸡、鹅 MSTN 基因全

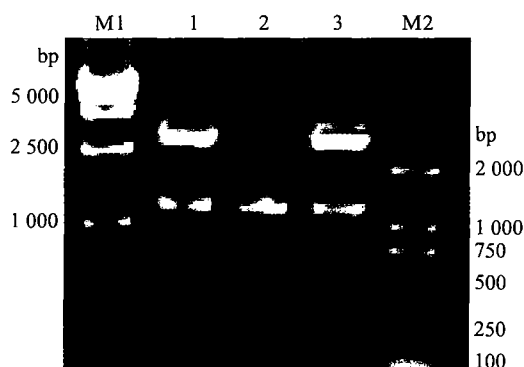
长均为 1 128 bp, 编码 375 个氨基酸, 最后 3 个碱基为终止密码子, 与预期的结果相符. 将本试验中所测的鸡、鹅的 MSTN 核苷酸序列分别转换为相应的氨基酸序列, 结果见图 4.



M 为 DNA 分子梯度; 1、2 分别为鸡、鹅 MSTN 的 RT-PCR 产物
M: DL 2 000 Marker; 1: MSTN RT-PCR product of chicken; 2: MSTN RT-PCR product of goose

图 1 鸡、鹅 MSTN 的 RT-PCR 产物

Fig. 1 RT-PCR product of MSTN



M1、M2 为 DNA 分子梯度; 1、3 分别为鸡、鹅 MSTN-pGEM-T Easy 的双酶切产物; 2 为 MSTN 的双酶切产物

M1: DL 15 000 Marker; M2: DL 2 000 Marker; 1: enzyme digestion product of chicken; 2: product of PCR; 3: enzyme digestion product of goose

图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by enzyme digestion

用 DNASTar 软件对所测的序列进行分析, 结果表明, 本试验所测的鸡、鹅 MSTN 核苷酸序列的同源性为 94.6%, 其中鸡 MSTN 核苷酸序列与 GenBank 中已存在的鸡 MSTN 核苷酸序列 (AF019621) 的同源性为 99.8%; 鹅 MSTN 核苷酸序列与 GenBank 中已存在的鹅 MSTN 核苷酸序列 (AF440861、AF440862、AF440863、AF440864) 同源性分别为 98.4%、98.9%、93.9%、94.0%. 鸡、鹅的 MSTN 核苷酸序列转换为相应的氨基酸序列的同源性高达 97.9%.

鸡 chicken	ATGCAAAAGC TAGCAGTCTA TGTATTATATT TACCTGTTCA TGCAGATCGC GGTGATCCA GTGGCTCTGG ATGGCAGTAG	80
鹅 goose	T.....A.....G.....T.....A.G....	
	TCAGCCCACA GAGAACGCTG AAAAAGACGG ACTGTGCAAT GCTTGACGT GGAGACAGAA TACAAAATCC TCCAGAATAG	160
	T.....T.....A.....T.....	
	AAGCCATAAA AATTCAAATC CTCAGCAAAC TGCGCCTGGA ACAAGCACCT AACATTAGCA GGGACGTTAT TAAGCAGCTT	240
	C.....T.....T.....T.....A.A...	
	TTACCCAAAG CTCCTCCACT GCAGGAACTG ATTGATCAGT ATGATGTCCA GAGGGACGAC AGTAGCGATG GCTCTTTGGA	320
	A.....A.....C.....A.....T.....	
	AGACGATGAC TATCATGCCA CAACCGAGAC GATTATCACA ATGCTACGG AGTCTGATTT TCTTGACAA ATGGAGGGAA	400
	T.A.....A.....	
	AACCAAATG TTGCTTCTTT AAGTTTAGCT CTAAATACA ATATAACAAA GTAGTAAAGG CACAATTATG GATATACTTG	480
	G.....	
	AGGCAAGTCC AAAACCTAC AACGGTGTTC GTGCAGATCC TGAGACTCAT TAAGCCCATG AAAGACGGTA CAAGATATAC	560
	A.....T.....	
	TGAATTCGA TCTTTGAAAC TTGACATGAA CCCAGGCACT GGTATCTGGC AGAGTATTGA TGTGAAGACA GTGCTGCAAA	640
	T.....T.....	
	ATTGGCTCAA ACAGCCTGAA TCCAATTTAG GCATCGAAAT AAAAGCTTTT GATGAGACTG GACGAGATCT TGCTGTGACA	720
	A.....A.T	
	TTCCAGGAC CGGGTGAAGA TGGATTGAAC CCATTTTATAG AGGTCAGAGT TACAGACACA CCGAAACGGT CCCGCAGAGA	800
	A.....A.....A.....	
	TTTTGGCCTT GACTGTGATG AGCACTCAAC GGAATCCCGA TGTGTGCGCT ACCCGCTGAC AGTGGAATTC GAAGCTTTTG	880
	C.....G..A.....A.....A.A..T.....T.....	
	GATGGGACTG GATTATAGCA CCTAAAGAT ACAAAGCCAA TTACTGCTCC GGAGAATGTG AATTTGTGTT TCTACAGAAA	960
	C.....T.....A.....	
	TACCCGCACA CTCACCTGGT ACACCAAGCA AATCCAGAG GCTCAGCAGG CCCTTGCTGC ACACCCACCA AGATGTCCCC	1040
	..T.....T..T..T.....G.....T.....G.....C.....G.....	
	TATAAATG CTGTATTCA ATGGAAAAGA ACAAATAATA TATGAAAAGA TACCAGCCAT GGTGTAGAT CGTTGCGGGT	1120
	C.....T...T.....C.....	
	GCTCATGA	1128
		

以鸡的序列为参照,鹅的序列与鸡的序列相比,相同部分用点来代替,仅列出序列不同部分
The DNA sequence of goose MSTN is compared to chicken MSTN, only the different bases are indicated

图 3 鸡、鹅 MSTN 的核苷酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of myostatin of chicken and goose

鸡 chicken	MQKLAVVYVI YLFMQIAVDP VALDGSQPT ENAEKDGLCN ACTWRQNTKS SRIEAIKIQI LSKLRLEQAP NISRDIKQL	80
鹅 goose	L.S.....DG.....T.....	
	LPKAPPLQEL IDQYDVQRDD SSDGSLEDDD YHATTETIIT MPTESDFLVQ MEGKPKCCFF KPSSKIYQN KVVKAQLWIYL	160
		
	RQVQKPTTVF VQILRLIKPM KDGTRYTGIR SLKLDMPNGT GIWQSIVKVT VLQNLWKQPE SNLGIEIKAF DETGRDLAVT	240
	N.....	
	FPGPGEDGLN PFLEVRVTDI PKRSRRDFGL DCDEHSTESR CCRYPLTVDF EAFGWDWIIA PKRYKANYCS GECEFVFLQK	320
		
	YPHTHLVHQA NPGSAGPCC TPTKMSPINM LYFNGKEQII YGKIPAMVVD RCGCS.	375
	L.....	

以鸡的序列为参照,鹅的序列与鸡的序列相比,相同部分用点来代替,仅列出序列不同部分
The amino acid sequence of goose MSTN is compared to chicken MSTN, only the different amino acids are indicated

图 4 鸡、鹅 MSTN 的氨基酸序列

Fig. 4 Deduced amino acid sequence of myostatin of chicken and goose

3 讨论

本试验获得的鸡、鹅 MSTN 基因的序列,通过 DNASTar 软件进行分析,发现鸡、鹅 MSTN 基因的同源性为 94.6%,而相应氨基酸序列的同源性高达 97.9%,说明尽管碱基突变造成 MSTN 核苷酸序列在鸡、鹅之间存在差异,但有些突变并没有使编码的氨基酸改变.

MSTN 基因序列在进化过程中高度保守^[6],实际上,已测定的大多数哺乳动物和鸟类的 MSTN 蛋白序列差别不大,功能也十分保守,这就使科学家利用 MSTN 基因改进肉食动物的肌肉质量(*m*)和品质成为可能.人类与小鼠的 MSTN C-末端氨基酸序列是一致的,MSTN 有可能作为人类肌肉衰竭病如癌症、AIDS 和肌肉营养失调等增加骨骼肌量的重要治疗目标^[8].所以,对 MSTN 的研究不仅具有科学的理论意

义,而且具有商业意义. 尽管研究 MSTN 对农业及生物医学具有重要意义,但是许多涉及 MSTN 作用机制的问题仍然没有答案,它的作用会不会影响其他生长系统也有待进一步研究. 本研究为探索 MSTN 的功能及作用机制奠定了良好的基础.

参考文献:

- [1] MCPHERRON A C, LAWLER A M, LEE S J. Regulation of skeletal muscle mass by a new TGF- β superfamily member [J]. *Nature*, 1997, 387(6 628), 83 - 90.
- [2] LIN J, ARNOLD H B, DELLA-FERA M A, et al. Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(3): 701 - 706.
- [3] CASAS E, KEELE J W, FAHRENKRUG S C, et al. Quantitative analysis of birth, weaning, and yearling weights and calving difficulty in Piedmontese crossbreds segregating an inactive myostatin allele [J]. *J Anim Sci*, 1999, 77(7): 1 686 - 1 692.
- [4] GROBET L, MARTIN L J R, PONCELET D, et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle[J]. *Nat Genet*, 1997, 17:71 - 74.
- [5] KAMBADUR R, SHARMA M, SMITH T P, et al. Mutations in myostatin in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle [J]. *Genome Res*, 1997, 7(9), 910 - 916.
- [6] MCPHERRON A C, LEE S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94:12 457 - 12 461.
- [7] 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 - 9.
- [8] MCPHERRON A C, LEE S J. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(5): 595 - 601.

【责任编辑 柴 焰】

·简 讯·

我校“抗菌新药防治畜禽感染性疾病的药理及应用研究”成果通过鉴定

2004年2月29日,广东省教育厅受广东省科技厅的委托,在华南农业大学主持了“抗菌新药防治畜禽感染性疾病的药理及应用研究”项目成果鉴定会. 鉴定委员会共9名专家,由中国农业大学沈建忠教授担任主任委员,广东省农业厅陈福林高级兽医师担任副主任委员.

该项目从1993年开始研究,至2003年完成,在10年里由国家自然科学基金、广东省自然科学基金等9项课题组成,由兽医学院陈杖榴教授主持,经30多位科研人员对猪、鸡和羊进行了10多种抗菌新药的研究工作,投入经费达500多万元,取得一批重大成果,培育出多种知名度较高的兽药品牌和名优兽药产品,为养殖企业防治禽畜感染性疾病带来的社会效益达222.18亿元.

鉴定委员会认真审阅了科技成果鉴定材料,听取了项目组的综合汇报,进行了充分的讨论,一致认为:该项目整体试验设计合理,技术路线正确,试验手段先进,数据可靠,超额完成了合同中的预期目标,研究成果既有较高学术水平,又具较强的实用性,对推动我国兽药研制开发的科技进步具有重要的理论和实践意义. 该成果总体水平达到国际先进水平,其中恩诺沙星等药物在多种疾病模型的药动学研究达到国际领先水平. 鉴定委员会一致同意通过该成果的鉴定,并建议进一步加强新兽药、新剂型的研制和应用,为发展我国的兽药产业做出更大贡献.

(华南农业大学科技处 李桂荣供稿)