

朗德鹅肌肉生成抑制因子基因 (MSTN) 的克隆及其表达量与日粮能量、血清 IGF-I 和 GH 的关系

胡骏鹏¹, 李翔¹, 张碧绿², 范卫星¹, 曹爱青¹, 赵阿勇¹, 何瑞国¹

(¹华中农业大学动物科技学院, 武汉 430070; ²湖北省天门市畜牧局, 湖北天门 431700)

摘要: 【目的】采用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术, 克隆朗德鹅肌肉生成抑制因子基因 (MSTN), 研究 MSTN 基因表达和日粮能量及其部分血清激素含量的相互关系, 了解 MSTN 的功能, 为水禽分子营养和分子育种提供基础资料。【方法】从朗德鹅 (*Anser anser*) 的腿肌中抽提总 RNA, 用两步法 RT-PCR 扩增出 MSTN 基因的 cDNA 编码序列, 以 pGEM-T Vector 为载体, 将该片段克隆到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中。通过筛选阳性克隆, 双酶切鉴定后测序; 以 MSTN 基因的克隆为基础, 以 β -actin 为内标, 构建优化的半定量 RT-PCR 方法, 研究高中低 (A: 13.38MJ·kg⁻¹, B: 12.13MJ·kg⁻¹, C: 10.87MJ·kg⁻¹) 3 种不同能量对朗德鹅 21 日龄和 70 日龄 2 个时期, 肌肉组织 MSTN 基因表达的差异; 同时用放免法测定 21、70 日龄的血清 GH 和 IGF-I 浓度。【结果】克隆朗德鹅 MSTN 基因 cDNA 的部分序列, 其片段大小为 1128bp, 编码 375 个氨基酸组成的多肽, 与已发表的鸡、鸭、鹅的 MSTN 核苷酸相似性分别为 94%、94%、99%; 氨基酸的相似性分别为 98%、97%、98%; 21 日龄时, 朗德鹅公鹅、母鹅 MSTN 表达量差异不显著; 70 日龄时朗德鹅公鹅 MSTN 的表达量情况为能量 A>C>B, 朗德鹅母鹅 MSTN 的表达量情况为 C>B>A; 对于朗德鹅 21~70 日龄阶段的生长, MSTN 基因的表达量和血清 IGF-I 的变化基本一致; 与血清 GH 含量之间并不存在很大关联, GH 和能量的高低呈正相关。【结论】日粮能量对 21 日龄后朗德鹅 MSTN 基因的表达有影响, 且 MSTN 基因表达量和血清 IGF-I 具有相关性, 和血清 GH 无较大相关性。

关键词: 朗德鹅; MSTN; 肌肉组织; 半定量 RT-PCR; IGF-I; GH

Cloning of MSTN Gene of Landes Goose and Research of Relationship Between MSTN Gene Expression and Different Energy Diets, or IGF-I and GH in Serum

HU Jun-peng¹, LI Xiang¹, ZHANG Bi-lü², FAN Wei-xing¹, CAO Ai-qing¹, ZHAO A-yong¹, HE Rui-guo¹

(¹College of Animal Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;

²Animal Husbandry Bureau of Tianmen City, Tianmen 431700, Hubei)

Abstract: 【Objective】The myostatin gene of Landes goose was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the relationship between MSTN gene expression and different energy diets, or IGF-I, GH levels in serum was researched in order to know the function of MSTN gene and provide information for molecular nutriology and breeding of water fowl. 【Method】Genome RNA was extracted from muscle of Landes goose, MSTN gene mRNA was amplified by RT-PCR, the PCR product was cloned into pGEM-T vector and transformed into *Escherichia coli*. The MSTN gene was isolated and sequenced from the positive clones screened. Based on the MSTN gene clone, β -actin as inner control, an optimal semi-quantitative RT-PCR method, was constructed to study the difference of MSTN gene expression at 21st and 70th day of Landes goose fed with different energy diets, and IGF-I and GH in serum were determined. 【Result】The unique DNA fragment about 1128 bp in length was obtained.

收稿日期: 2006-09-08; 接受日期: 2007-06-25

基金项目: 国家“十一五”湖北省科技攻关计划 (2005AA205A08)

作者简介: 胡骏鹏 (1980-), 男, 湖北钟祥人, 博士研究生, 研究方向为水禽分子营养。Tel: 027-87281033; Fax: 027-87281033; E-mail: hjphoo@163.com. 通讯作者何瑞国 (1963-), 男, 白族, 贵州六盘水人, 教授, 研究方向为水禽分子营养。Tel: 027-87280479; Fax: 027-87280479

Sequence analysis revealed that it has a length of 1128 nucleotides which encodes a peptide of 375 amino acids. Compared with homo logous sequence of chicken, duck and goose, it displayed a fairly high degree conservation. The homology of the nucleotide sequence were 94%, 94%, and 99%, respectively; the homology of the amino acid sequence were 98%, 97%, and 98%, respectively; at 21st day and 70th day, the results showed that the expression of MSTN in female Landes geese was a little higher than male at 21st day; the expression of MSTN in male was $A > C > B$ at 70th day, female was $C > B > A$ by at 70th day; In the period of 21-70days, the expression of MSTN was changed with IGF-I in serum; it was not associated with GH in serum, GH was significantly correlated with energy. 【Conclusion】 Energy influences MSTN gene expression of Landes goose after 21 days; and MSTN gene expression is associated with IGF-I in serum, but it is not associated with GH in serum.

Key words: *Anser anser*; MSTN; Muscle; Semi-quantitative RT-PCR; IGF-I; GH

0 引言

【研究意义】肌肉生成抑制因子基因 (MSTN, 又称为 GDF-8 或者 myostatin), 属于 TGF- β 家族。MSTN 基因是 Mcpherron 等于 1997 年首次在小鼠骨骼肌中发现的。它在小鼠胚胎生肌节区表达, 具有抑制肌肉发育的功能, 成年后该基因继续表达^[1,2]。目前, 研究者将 MSTN 基因视为大幅度提高畜禽肌肉生长和瘦肉率的首选基因^[3,4]。MSTN 突变对动物肌肉生长有较大的影响^[5-7]。研究水禽 MSTN 基因的基本功能对于水禽养殖业和水禽育种都具有实际意义。【前人研究进展】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, 其功能为抑制肌肉生长。Zimmers 等报道, 系统注射 myostatin 可以诱导小鼠极度瘦弱症^[8]。有研究者设想通过 MSTN 基因来调控畜禽的肌肉生长^[9,10], 目前已经克隆到小鼠、猪、牛、鸡、鹅等物种的 MSTN 基因的部分序列, 但是有关营养素对该基因表达的调控研究资料很少。动物生长发育受到内分泌和营养的调控, 生长激素 (GH) 和类胰岛素生长因子 (IGF-I) 轴是激素和营养实现生长调控的主要机制。研究表明, IGF 在动物生长发育过程中既是 GH 发挥作用的最主要介导因子, 又具有与 GH 无关的独特作用^[11]。【本研究切入点】本试验首先克隆朗德鹅 MSTN 基因, 然后设计在保证蛋白质需要情况下的三种能量梯度日粮, 通过检测 MSTN 基因的两个阶段的表达量和同时期的血清 GH 和 IGF-I 的浓度, 试图找到一些相关的联系, 为以后水禽大规模群体研究 MSTN 基因提供基础资料, 同时为水禽生产的营养调控提供数据。【拟解决的关键问题】克隆朗德鹅的 MSTN 基因, 通过半定量 RT-PCR 的方法, 研究关键日龄 MSTN 基因的表达量, 分析 MSTN 基因表达与日粮能量和同日龄血清 IGF-I、GH 的相互联系, 从而探讨 MSTN 基因的表达在朗德鹅生长发育早期的基本情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 朗德鹅腿肌取自华中农业大学动物科技学院鹅肥肝繁育基地。取 21 d, 70 d 的采食 3 种不同能量饲料的朗德鹅各 6 只 (公母各半), 共计 36 只, 解剖后取其腿肌组织。

1.1.2 试验日粮和饲养试验 设计 13.38 MJ·kg⁻¹、12.13 MJ·kg⁻¹、10.87 MJ·kg⁻¹ 3 种能量水平的日粮, 粗蛋白 20%, 其它指标参照 NRC (1994) 饲养标准^[5]。试验日粮于华中农业大学饲料车间生产配制。

朗德鹅的饲养: 挑选 0 日龄时出生体重大致相同的朗德鹅 180 只 (公母各半), 分 6 栏饲养, 每栏 30 只, 公母分开饲养。0~21 d 采用架上平养, 22~70 d 采用地面平养。每天记录采食量, 日增重, 青饲料和精饲料按照 1.5~2 : 1 的比例饲喂。

1.1.3 酶和试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司; DNA 回收试剂盒购自上海生工; 反转录酶、dNTP、Taq DNA 聚合酶及其缓冲液、pGEM-T vector 试剂盒购自 Promega 公司。

1.1.4 试验地点 动物试验在华中农业大学动物科技学院鹅肥肝繁育基地进行; 分子生物学试验在华中农业大学农业部微生物国家重点实验室进行; 血清 IGF-I、GH 的分析于华中农业大学水产学院进行; 其它常规分析在华中农业大学动物科技学院动物营养实验室进行。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的抽提和 cDNA 第一链的合成 取 50~100 mg 腿肌按照 Trizol 试剂盒说明书抽提总 RNA, 利用紫外分光光度计和甲醛琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和浓度。检测后的总 RNA 置于 -80℃ 冰箱保存或立即进行反转录。按照 Promega 公司提供的反应条件进行, 反转录酶为 M-MLV RT, 引物为 oligod (T), 总反应体系为 25 μ l, RNA 3 μ l, oligod (T) 1

μl , $5\times\text{buffer}$ $5\ \mu\text{l}$, dNTP $5\ \mu\text{l}$, M-MLV RT $1\ \mu\text{l}$, Rnasin $0.5\ \mu\text{l}$, DEPC H_2O $9.5\ \mu\text{l}$, 其中 RNA 和 oligod (T) 混和后先 70°C 变性 $5\ \text{min}$, 冰浴 $2\ \text{min}$, 后于体系中其它物质混和, 室温放置 $5\ \text{min}$, 42°C 保温 $1\ \text{h}$, 74°C , RT 产物于 -20°C 保存备用。

1.2.2 引物设计 根据已报道的鹅 MSTN 的序列(基因编号为 AF440862) 设计 3 对引物, 用于扩增 MSTN 基因 cDNA 全长的上游引物 P1 位于 1~22 碱基处, 下游引物 P2 位于 1 109~1 128 碱基处; 另设计一对半定量 RT-PCR 引物, 上游引物 P3 位于 239~258 碱基处, 下游引物 P4 位于 819~838 碱基处; 根据报道的鹅的 β -actin 设计内标引物 P5、P6, P5 位于 946~965 碱基处, P6 位于 1 421~1 440 碱基处。

P1: 5'-ATGCAAAGCTAGCAGTCTATG-3'

P2: 5'-TCATGAGCACCCGCAACGAT-3'

P3: 5'-TTTTACCCAAAGCTCCTCCA-3'

P4: 5'-TGGATTCTGTGAGTGCTCA-3'

P5: 5'-AAGGACCTGTACGCCAACAC-3'

P6: 5'-GACACCGAGGGAGCAGAGAA-3'

引物全部由上海生工合成, 使用前均稀释到 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

1.2.3 聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 PCR 反应在 Master gradient PCR 仪 (Eppendorf 公司) 进行。PCR 反应体系如下: 灭菌水 $34\ \mu\text{l}$, Buffer $5\ \mu\text{l}$, MgCl_2 $4\ \mu\text{l}$, dNTP $4\ \mu\text{l}$, 上下游引物各 $1\ \mu\text{l}$, cDNA $1\ \mu\text{l}$, 总体积 $50\ \mu\text{l}$ 。3 个反应条件分别为: (1) 扩增全长条件: 95°C $5\ \text{min}$; 94°C $30\ \text{s}$, 50°C $40\ \text{s}$, 72°C $90\ \text{s}$, 30 个循环; 72°C $10\ \text{min}$, 4°C 保存; (2) 半定量 RT-PCR 扩增 MSTN 片段条件: 95°C $5\ \text{min}$; 94°C $30\ \text{s}$, 58°C $40\ \text{s}$, 72°C $45\ \text{s}$, 30 个循环; 72°C $10\ \text{min}$, 4°C 保存; (3) 内标 β -actin 扩增条件: 95°C $5\ \text{min}$; 94°C $30\ \text{s}$, 60°C $30\ \text{s}$, 72°C $30\ \text{s}$, 28 个循环; 72°C $10\ \text{min}$, 4°C 保存。扩增后产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外灯下观察。

1.2.4 MSTN 的克隆和鉴定 利用 DNA 回收试剂盒回收目的片段。回收后的目的片段在 T4 连接酶的作用下与 pGEM-T 载体连接过夜, 转化 DH5- α 大肠杆菌感受态细胞, 涂布在含有氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LB 平板上进行蓝白斑筛选, 挑取白色单个菌落进行培养, 小提质粒, 命名为 pGEM-T-MSTN, 利用 PCR 和双酶切 (*Gst* I 和 *Ecro* I) 进行鉴定后, 阳性克隆送北京华大公司进行测序。

1.2.5 MSTN 序列分析 利用 NCBI 网站上的 blast

进行序列对比分析、核苷酸和氨基酸序列的相似性分析, 利用 DNASTar 等 DNA 分析软件进行 MSTN 基因的序列分析。

1.2.6 半定量 RT-PCR 方法研究不同能量对 MSTN 基因表达量的检测 采用 1.2.1 的方法对 3 种采食不同能量的朗德鹅肌肉样品 (21 d、70 d) 提取总 RNA 和反转录, 利用设计的鹅 β -actin 引物 P5、P6 进行 cDNA 的定量调整, 得到片段大小为 $500\ \text{bp}$ 左右的目的条带, 与设计相符, 最后得到最佳的循环数为 28 时, 未到平台期, 可以作为衡量标准, 通过改变扩增时反应体系中 cDNA 浓度把条带的亮度调整到相同的水平, 并把调整好的 cDNA 的量用于下一步的半定量 RT-PCR 检测; 利用设计的 MSTN 基因部分序列的引物 P3、P4 对获得的已经调整好的 cDNA 浓度进行半定量 RT-PCR 检测, 循环数为 30, 得到片段大小为 $600\ \text{bp}$ 左右的目的条带, 和设计的相符。PCR 扩增条件同 1.2.3。

1.2.7 血清 IGF-I 和 GH 的测定 屠宰取样前 2 h 进行腿静脉采血, 采血 $4\ \text{ml}$ 直接注入抗凝管, 后立即于 4°C 下 $3\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 $15\ \text{min}$, 血清于 -20°C 保存待测。IGF-I 和 GH 的测定采用平衡饱和放射免疫分析法 (RIA)。放免试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司, 方法按照其提供的使用说明书进行, 仪器为科大创新股份有限公司中佳分公司生产的 GC-911 γ 放射免疫计数器, GC-1200 分析系统。

1.3 数据处理

数据用 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示, 显著性分析用 SPSS 10.0 中 One-way anova 模块的 Duncan 分析。

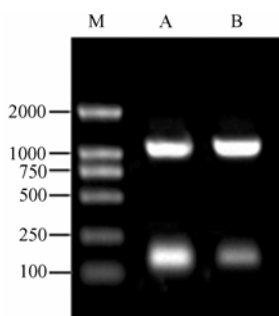
2 结果与分析

2.1 鹅 MSTN-cDNA 的扩增和重组质粒 pGEM-T-MSTN 的构建

采用 RT-PCR 技术, 从朗德鹅腿肌中提取总 RNA, 利用设计的引物 P1、P2 扩增出长度为 $1\ 100\ \text{bp}$ 左右的片段。

片段回收后将其克隆到 pGEM-T 载体中, 用 PCR 和双酶切进行鉴定。结果表明: 扩增得到的片段和设计的片段大小相符 (图 1); 将构建好的质粒 pGEM-T-MSTN 用 *Gst* I 和 *Ecro* I 进行双酶切后, 得到分子量为 $3\ 500\ \text{bp}$ 左右和 $650\ \text{bp}$ 左右的两条 DNA 片段 (图 2)。对鹅 MSTN 进行测序, 并和已经发表的鸡 (AF019621)、鸭 (AF440864)、鹅 (AF440862) MSTN 基因序列进行比对。结果表明: 朗德鹅 MSTN

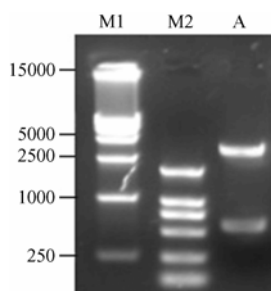
基因核苷酸编码序列与鸡、鸭和鹅 MSTN 基因核苷酸编码序列相似性分别为 94%、94%、99%；氨基酸相似性分别为 98%、97%、98%。



A、B 表示 MSTN 的 PCR 产物；Maker 为 DL 2 000
A、B: RT-PCR product of MSTN; Maker: DL2 000

图 1 MSTN 的 RT-PCR 产物检测

Fig. 1 RT-PCR product of MSTN



M1: DL15 000 Maker; M2: DL2 000 Maker; A: 酶切后片段
M1: DL15 000 Maker; M2: DL2 000 Maker; A: fragment by enzyme digestion

图 2 pGEM-T-MSTN 的双酶切检测

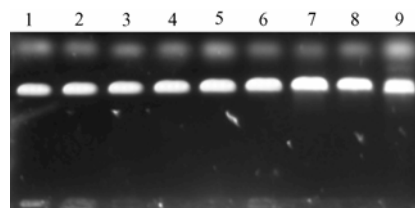
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by enzyme digestion

2.2 朗德鹅内标 β -actin 基因浓度的调整

总 RNA 进行反转录得到 cDNA，用引物 P5、P6 进行扩增，cDNA 为 1 μ l，28 个循环后进行的琼脂糖凝胶电泳，通过 Image Master VDS software 进行分析后进行扩增体系中 cDNA 浓度调整，使内标 β -actin 浓度达到一致。调整 cDNA 浓度后再进行 PCR 扩增检测，电泳后得图谱（图 3），分析表明内标 β -actin 的浓度基本一致，可以采用调整后的 cDNA 浓度对 MSTN 基因进行半定量检测。

2.3 不同能量、不同性别龄朗德鹅 21 和 70 日 MSTN 基因的表达量

分别以不同样品中的 β -actin 基因为内标，对样品的 MSTN 基因表达水平进行半定量 RT-PCR 检测。得

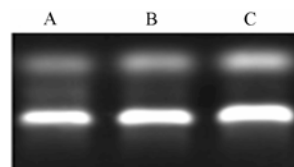


1-9: 不同的 cDNA 样品的 β -actin 扩增产物情况
1-9: RT-PCR product of β -actin of different cDNA samples

图 3 内标 β -actin 的浓度检测

Fig. 3 RT-PCR product of β -actin

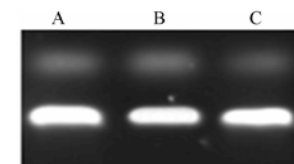
到以下图谱：不同能量组朗德鹅公鹅 21d MSTN 基因的表达量图谱（图 4）、不同能量组朗德鹅母鹅 21d MSTN 基因的表达量图谱（图 5）、不同能量组朗德鹅公鹅 70d MSTN 基因的表达量图谱（图 6）、朗德鹅母鹅 70d MSTN 基因的表达量图谱（图 7）。



A: 13.38MJ·kg⁻¹; B: 12.13MJ·kg⁻¹; C: 10.87MJ·kg⁻¹

图 4 朗德鹅公鹅 21 日龄 MSTN 基因的表达量

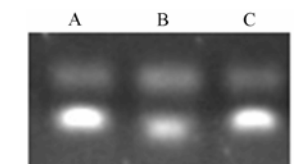
Fig. 4 Male landes geese MSTN gene expression at 21 days



A: 13.38MJ·kg⁻¹; B: 12.13MJ·kg⁻¹; C: 10.87MJ·kg⁻¹

图 5 朗德鹅母鹅 21 日龄 MSTN 基因的表达量

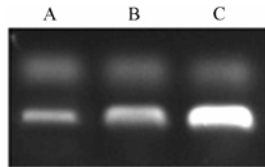
Fig. 5 Female landes geese MSTN gene expression at 21 days



A: 13.38MJ·kg⁻¹; B: 12.13MJ·kg⁻¹; C: 10.87MJ·kg⁻¹

图 6 朗德鹅公鹅 MSTN 基因 70 日龄的表达量

Fig. 6 Male landes geese MSTN gene expression at 70 days



A: 13.38MJ·kg⁻¹; B: 12.13MJ·kg⁻¹; C: 10.87MJ·kg⁻¹

图 7 朗德鹅母鹅 MSTN 基因 70 日龄的表达量

Fig. 7 Female landes geese MSTN gene expression at 70 days

通过图 4~7 可以发现, 21 日龄时, 朗德鹅公鹅、母鹅 MSTN 表达量差异不明显; 70 日龄时, 采食能量为 12.13 MJ·kg⁻¹ 朗德鹅公鹅其 MSTN 基因的表达量最低, 而 13.38 MJ·kg⁻¹ 组表达量最高, 朗德鹅公鹅 MSTN 的表达量为 A>C>B。采食能量为 13.38 MJ·kg⁻¹ 的朗德鹅母鹅 MSTN 基因的表达量最低, 而 10.87 MJ·kg⁻¹ 组表达量最高, 总体来说朗德鹅母鹅 MSTN 基因表达量为 C>B>A。

分析 21 d 和 70 d 扩增条带的亮度, 得到公鹅 MSTN 基因表达量变化表 (图 8) 和母鹅 MSTN 基因变化表 (图 9)。

通过图 8 分析朗德鹅公鹅 21 d、70 d MSTN 基因表达量, 发现 A、B、C 3 组 MSTN 基因表达量呈下

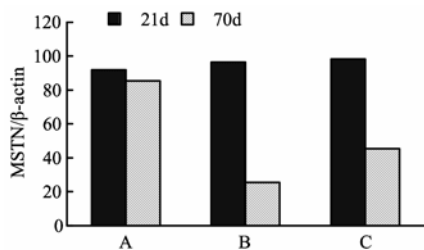


图 8 朗德鹅公鹅 MSTN 基因 21d、70d 表达量分析图

Fig. 8 Male geese MSTN gene expression at 21, 70d

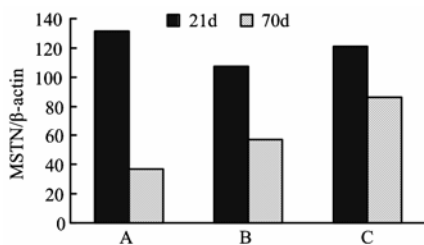


图 9 朗德鹅母鹅 MSTN 基因 21d、70d 表达量分析图

Fig. 9 Female geese MSTN gene expression at 21, 70d

降趋势, 且 B 组下降程度最大; 通过图 9 分析朗德鹅母鹅 21 d、70 d 母鹅 MSTN 基因表达量, 发现 A、B、C 3 组也呈下降趋势, 其中 A 组下降程度最大。

2.4 3 种不同能量组朗德鹅 21 日龄和 70 日龄体重、血清 IGF-I 和 GH 水平

朗德鹅公鹅 21 d、70 d 体重、血清 IGF-I 和 GH 测定结果见表 1; 朗德鹅母鹅 21 d、70 d 体重、血清 IGF-I 和 GH 测定结果见表 2。

结果表明, 21 d 时朗德鹅公鹅的体重差异不显著 ($P>0.05$); 70 d 公鹅体重 B 组和 A、C 两组差异显著 ($P<0.05$)。对于公鹅血清 IGF-I 水平, 21 d 时试验组间差异显著 ($P<0.05$), 其中 B 组的测定值最高; 70 d 时, 试验组血清 IGF-I 水平差异显著 ($P<0.05$)。

21 d、70 d 朗德鹅母鹅 A、B、C 3 组体重差异显著 ($P<0.05$), 且体重大小顺序为 A>B>C。对于 21~70 d, 能量对于母鹅体重的影响与能量对于母鹅 MSTN 基因表达量的影响是吻合的。对于母鹅血清 IGF-I 水平, 21 d 时 A 组和 B、C 的两组差异显著 ($P<0.05$), 70 d 时 C 组和 A、B 两组差异显著 ($P<0.05$)。

表 1 21、70 日龄朗德鹅公鹅体重、血清 IGF-I 和 GH 分析表

Table 1 Male geese weight, IGF-I and GH levels in serum at 21, 70 days

项目	日龄	能量水平		
		Energy diet		
Item	Day	A	B	C
体重(kg)	21	1.14±0.20a	1.15±0.19a	1.13±0.09a
Weight	70	4.19±0.63a	4.37±0.89b	4.22±0.46a
IGF-I	21	134.18±29.42ab	171.61±21.50b	77.12±11.06a
(ng·ml ⁻¹)	70	111.12±9.61ab	104.29±8.07a	122.61±12.48b
GH	21	1.52±0.30b	1.04±0.24ab	0.89±0.21a
(ng·ml ⁻¹)	70	0.44±0.10b	0.28±0.03a	0.31±0.02a

A: 13.38MJ·kg⁻¹; B:12.13MJ·kg⁻¹; C:10.87MJ·kg⁻¹; 同行小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)。下同

A: 13.38MJ·kg⁻¹; B:12.13MJ·kg⁻¹; C:10.87MJ·kg⁻¹; numbers with different superscript means difference significantly ($P<0.05$). The same as below.

表 2 21、70 日龄朗德鹅母鹅体重、血清 IGF-I 和 GH 分析表

Table 2 Female geese weight, IGF-I and GH Levels in serum at 21,70 days

项目	日龄	能量水平		
		Energy diet		
Item	Day	A	B	C
体重(kg)	21	1.16±0.12b	1.08±0.16ab	1.02±0.14a
Weight	70	4.25±0.36b	3.98±0.34ab	3.68±0.85a
IGF-I	21	142.73±21.14b	122.29±30.96a	125.32±23.43a
(ng·ml ⁻¹)	70	112.75±26.18a	116.82±10.25a	134.90±3.27b
GH	21	0.99±0.16b	0.76±0.12ab	0.57±0.14a
(ng·ml ⁻¹)	70	0.88±0.06b	0.51±0.11ab	0.27±0.02a

另外,对于 GH 来说,21 d 和 70 d 朗德鹅无论公母,血清 GH 水平和日粮能量水平呈正相关。

3 讨论

本试验通过 RT-PCR 的方法从朗德鹅的腿肌 cDNA 中扩增出 MSTN 基因,克隆到 pGEM-T 载体,经过转化后提质粒进行 PCR 和双酶切鉴定后测序。测序结果表明, MSTN 的 cDNA 序列共 1 128 个核苷酸,编码 375 个氨基酸。而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^[13,14]。和其它物种进行序列比较,同源性很高,特别是 C-端同源性超过 99%。McPherron 等用小鼠保守的 C-末端 cDNA 为探针筛选其它物种的骨骼肌 cDNA 文库,进行序列分析发现 MSTN 在不同物种之间十分保守,就 C-端而言,人、小鼠、大鼠、猪、鸡和火鸡的同源性为 100%^[1],本试验的序列分析和 Mcpherron 的结论相同。

预实验证明,如果直接采用 MSTN 基因的 cDNA 全长进行表达量分析,效果较差,后经测序后得到序列进行分析,重新设计半定量 RT-PCR 的引物 P3、P4 进行后面的半定量实验,效果较好。

目前国内外研究 MSTN 基因功能的资料较多,但是研究具体的营养素对 MSTN 基因表达的资料较少,而且主要集中于人、牛、小鼠和猪这些物种。有关水禽 MSTN 基因的研究资料较缺乏。研究结果显示,大多数哺乳动物和鸟类的 MSTN 蛋白分子的活性部分序列是一致的^[1],而且所有成年动物的骨骼肌都可以检测到 MSTN 基因的表达^[15,16]。所以研究水禽 MSTN 基因可以借鉴别的物种的方法,同时获得的结果也具有一定的通用性。

胡兰以大骨鸡为材料,发现 MSTN 基因在孵化前的表达水平高于孵化后的表达水平^[16]; Ji 等在猪中也有相似的报道, MSTN mRNA 水平在出生后有所降低^[17];牛 MSTN mRNA 水平在妊娠 90d 左右较高,而在妊娠后期水平较低^[18]。这些研究均证实动物出生前的 MSTN 基因的 mRNA 水平较高,出生及出生后水平降低,反映了 MSTN 在成肌细胞生长、分化和融合过程中有调节作用。对小鼠和猪进行限饲不会影响 MSTN 基因的 mRNA 水平,说明 MSTN 基因的生理作用可能和出生前的肌肉生长有关^[19,20]。

中国目前朗德鹅养殖业发展很快,朗德鹅公鹅主要用于鹅肥肝生产,母鹅通常用于繁殖后代。如何能够让朗德鹅尽快的达到填肝体重或产蛋体重是生产者很关心的问题。目前,国内外研究资料对 MSTN 基因

如何影响肌肉生长的原因不是很清楚,研究人员设想通过抑制 MSTN 的表达来大幅度提高肌肉的生长,而且 MSTN 很可能成为提高瘦肉率和加快动物增重的首选基因^[21]。日粮能量是最重要的营养素之一,在生产中容易实现调控,了解能量因素对朗德鹅生长前期 MSTN 的表达是以后能够采用综合手段进行营养调控的基础。

本试验通过不同能量日粮对朗德鹅前 21 日龄和 70 日龄两个阶段分性别进行研究,发现 0~21 日龄 MSTN 基因的表达量差异不明显;70 d 时表达量差异较大。对于 70 d 时公鹅,能量水平最高(13.38 MJ·kg⁻¹)组 MSTN mRNA 表达量最高,能量最低(10.87 MJ·kg⁻¹)组表达量其次,能量水平适中(12.13 MJ·kg⁻¹)的组表达量最低;对于母鹅来说,则是随着能量水平的降低, MSTN 基因表达量依次提高。说明 MSTN 基因表达量与朗德鹅的性别有关系,而且日粮能量的高低对于 22~70 d 鹅的生长和 MSTN 基因的表达有一定影响。

IGF-I 在动物生长发育中起着重要的调节作用,营养调控 IGF-I 的机制目前仍不完全清楚,禽类 IGF-I 可能具有与哺乳动物不同的其它生物学作用。外源注射 IGF-I 可以降低胴体脂肪含量,但对体增重可能没有明显促进作用。通过遗传选育培育出的高生长速度的现代肉鸡,其 IGF-I 的合成与分泌量反而下降^[22]。同时, GH 对动物的生长发育没有直接作用^[23]。IGF-I 对蛋白质不足比 GH 对蛋白质不足更加敏感^[24]。本试验采用的日粮粗蛋白为 20%,可以满足朗德鹅生长需要,试验设计消除了蛋白质对 IGF-I 和 GH 的影响后,21 d 和 70 d 得到的血清 GH 和 IGF-I 对于解释生长情况的变化是可行的。结果说明,朗德鹅生长前期血清 IGF-I 的含量和生长速度呈正相关,血清 GH 的含量和能量的高低呈正相关。

从本试验结果可以发现,朗德鹅 MSTN 基因表达量和日粮能量、血清 IGF-I 含量存在一定的关系。朗德鹅公鹅 A、B 组的血清 IGF-I 水平呈下降趋势,其中 B 组的下降程度较 A 组大, C 组的血清 IGF-I 含量呈上升趋势,这个趋势和朗德鹅公鹅 MSTN 基因表达量在 21 d 和 70 d 对比的趋势是一致的。对于 21~70 d 这个阶段,能量对于母鹅体重的影响和能量对于母鹅 MSTN 基因表达量的影响是吻合的。对比 21 d 和 70 d 母鹅血清 IGF-I 测定值, A、B 两组的血清 IGF-I 呈下降趋势,这和母鹅 MSTN 基因表达量在 21 d 和 70 d 的表现是一致的。可见 MSTN 基因的表达量和血清

IGF-I 的变化是基本一致的, 两者是否存在相互影响还未见资料报道。本结果和 Anthony Guernec 提出的营养供给可以同时影响 MSTN 和 IGF-I 的 mRNA 水平的结果是类似的^[25]。从本试验结果来看, MSTN 基因的表达量与血清 GH 含量之间并不存在较大关联。

4 结论

日粮能量对 21 日龄后朗德鹅 MSTN 基因的表达有影响, 且 MSTN 基因表达量和血清 IGF-I 具有相关性, 和血清 GH 无较大相关性。

References

- [1] McPherron A C, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94: 12457-12461.
- [2] McPherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*, 1997, 387(6628): 83-89.
- [3] 马现永, 施振旦, 曹永长, 毕英佐, 马静云. 鸡、鹅肌肉生成抑制因子基因的克隆和序列分析. 华南农业大学学报(自然科学版), 2004, 25(2): 85-88.
Ma X Y, Shi Z D, Cao Y C, Bi Y Z, Ma J Y. Cloning and sequencing analysis of myostatin gene of chicken and goose. *Journal of South China Agricultural University(Natural Science Edition)*, 2004, 25(2): 85-88. (in Chinese)
- [4] McPherron A C, Lee S J. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 2002, 109: 595-601.
- [5] Grobet L, Martin L J, Poncelet D. A deletion in bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nature Genetics*. 1997, 17: 71-74.
- [6] Kambadur R, Sharma M, Smith T P. Mutations in myostatin in double-muscled belgian blue and piedmontese cattle. *Genome Research*, 1997, 7: 910-916.
- [7] Lin J, Arnold H B, Della-Fera M A. Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 291: 701-706.
- [8] Zimmermann T A, Davies M V, Koniaris L G, Haynes P, Esquela A F, Tomkinson K N, McPherron A C, Wolfman N M, Lee S J. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science*, 2002, 296(5572): 1468-1494.
- [9] Sharma M, Langley B, Bass J, Kambadur R. Myostatin in muscle growth and repair. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 2001, 29 (4): 155-158.
- [10] Lee S J, McPherron A C. Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1999, 9: 604-607.
- [11] 张克英, 陈代文. 类胰岛素生长因子及其营养调控. 中国畜牧杂志, 2002, 38(6): 42-44.
Zhang K Y, Cheng D W. Insulin-like growth factor and its nutritional manipulation. *Chinese Journal of Animal Science*, 2002, 38(6): 42-44. (in Chinese)
- [12] National Research Council, *Nutrient Requirements of Poultry* (9th Edition), Washington D. C.: National Academy Press, 1994.
- [13] Sharma M, Kambadur R, Matthews K G. Myostatin, a transforming growth factor- β superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *Journal of Cellular Physiology*, 1999, 180: 1-9.
- [14] Rios R, Cameiro I, Arce V M, Devesa J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2002, 282(5): C993-999.
- [15] 吕文发. 猪肌生成抑制素(Myostatin, MSTN)表达及组织定位研究. 博士学位论文中国人民解放军军事医学科学院, 2003: 11-13.
LÜ W F. *Porcine Myostatin gene Expression and Its Location in Different Tissues*. Ph D dissertation, Veterinary College of PLA. 2003: 11-13. (in Chinese)
- [16] 胡 兰, 郭东新, 胡 锐, 刘 梅, 王 娜, 栾新红. 大骨鸡中 MSTN 基因表达规律性的研究. 动物科技, 2003, 20(11): 42-44.
Hu L, Guo D X, Hu R, Liu M, Wang N, Luan X H. Expression rule of MSTN gene in big bones chicken. *Animal Technology*, 2003, 20 (11), 42-44. (in Chinese)
- [17] Ji S, Losinski R L, Cornelius S G, Frank G R, Willis G M, Gerrard D E, Depreux F F S, Spurlock M E. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *American Journal of Physiology*, 1998, 275: R1265-R1273.
- [18] Sonstegard T S, Rohrer G A, Smith T P. Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. *Animal Genetics*, 1998, 29(1): 19-22.
- [19] Carlson C, Both F W, Gordon S E. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *American Journal of Physiology*, 1999, 277: R601-R606.
- [20] Thomas M L, Angley B, Berry C. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 40235-40243.
- [21] 马现永, 曹永长, 舒鼎铭, 毕英佐. 肌肉生成抑制因子基因的克隆、表达及动物免疫实验. 中国科学 C 辑, 2004, 34: 522-526.
Ma X Y, Cao Y C, Shu D M, Bi Y Z. Cloning and expression of

- myostatin gene and animal immunity experiment. *Science in China Series C*, 2004, 34: 522-526. (in Chinese)
- [22] McMurty J P. Nutritional and developmental roles of insulin-like growth factors in poultry. *Journal of Nutrition*, 1998, 128: 302S-305S.
- [23] Campion D R, Novakofski J. Technical perspective of biotechnology for control of growth and product quality in meat product. In: Pvan der Wal, Weber G M, van der Wilt F J. *Biotechnology for Control of Growth and Product Quality in Meat Production: Implications and Acceptability*. The Netherlands: Pudoc Wageningen, 1991: 17-18.
- [24] Lauterio T J, Scanes C G. Hormonal responses to protein restriction in two strains of chickens with different growth characteristics. *Journal of Nutrition*, 1987, 117: 758-763.
- [25] Guernec A, Chevalier B, Duclos M J. Nutrient supply enhances both IGF-I and MSTN mRNA levels in chicken skeletal muscle. *Domestic Animal Endocrinology*, 2004, 26: 143-154.

(责任编辑 高 雨)