

猪、鸡、鸭 Myostatin 成熟区段 DNA 的克隆及其同源性分析

黎真¹, 牛冬², 阮晖², 傅衍^{2*}

(1. 温州医学院生命科学学院, 温州 325035; 2. 浙江大学动物科技学院, 杭州 310029)

摘要: 克隆了金华猪、仙居鸡和绍鸭 Myostatin 成熟区段的 DNA, 并测定了各自的序列, 通过与 GenBank 中登录的相应物种的序列比较, 发现金华猪存在 1 个碱基的变异 ($T^{261} \rightarrow A^{261}$), 仙居鸡存在 2 个碱基的变异 ($T^{218} \rightarrow C^{218}$, $C^{219} \rightarrow T^{219}$), 鸭的序列在 GenBank 中还未见报道。用软件对三者及其它物种的序列做了同源性分析, 结果表明, Myostatin 在不同物种间具有高度的保守性, DNA 同源性均在 81% 以上(除鱼外), 提示其具有重要的生理功能, 并用软件分析了该基因在不同物种中的变异, 构建了系统进化树, 并对各物种之间的亲缘进化关系进行了分析。

关键词: 猪; 鸡; 鸭; Myostatin; 同源性分析

中图分类号: S813.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)04-0323-05

肌肉生长抑制素 (Myostatin) 又称 GDF-8 (growth differentiation factor-8), 是最近发现的影响骨骼肌生长发育的负调控因子, 属于 TGF- β 超家族。1997 年, McPherron 等^[1] 首先在小鼠的骨骼肌中克隆了 Myostatin 基因, 并发现其仅在骨骼肌中特异地表达。基因剔除的研究结果表明, 敲除了 Myostatin 基因的突变体小鼠比正常小鼠骨骼肌增重 2~3 倍, 纯合体小鼠可正常生殖, 其它组织器官均正常。

Myostatin 基因包括 3 个外显子和 2 个内含子, 其中第 3 个外显子是它的成熟区(见图 1)。该基因的前体是含有 376 个氨基酸残基的多肽, 包括: N-端疏水的信号肽序列, 可籍以跨越内质网膜; 前区的糖基化位点; 紧挨着生物活性区由 4 个氨基酸 (RSRR) 组成的蛋白酶加工位点, 以及 C-末端包含 9 个保守的半胱氨酸的生物活性区, 靠分子间的二硫键形成二聚体^[2]。

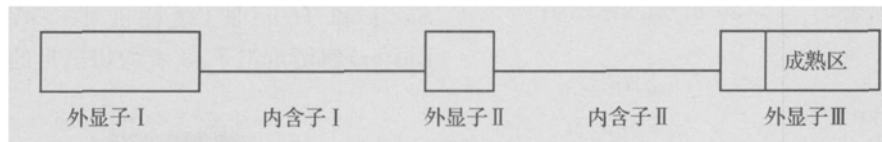


图 1 Myostatin 结构示意图

Fig. 1 Illustration of the genomic structure of Myostatin

通过抑制 Myostatin 的活性而增加肌肉量, 在农业和医疗上有潜在的应用价值; 同时也将为畜牧业肉用动物的育种开辟一条新途径。本研究克隆和测序了猪、鸡、鸭 3 种不同动物 Myostatin 成熟区段的 DNA, 并用 DNAMAN、Seqman 等分析软件对 3 者的序列进行了比较分析, 为今后开发利用 Myo-

statin 基因, 生产 Myostatin 疫苗提高动物产肉率奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 基因组 DNA 的提取

采金华猪血样、绍鸭血样及仙居鸡血样。使用传统的酚/氯仿/异戊醇方法抽提基因组 DNA, TE 溶解后 -20 °C 保存。

1.2 主要试剂

PCR 引物由上海 Sangon 公司合成, EcoR I、Not I、Sac I 和 Hind III 种限制性内切酶购自上海 Sangon 公司; 克隆载体 pUCm-T、Taq 酶购自上

收稿日期: 2003-11-21

基金项目: 浙江省科技计划项目(2003C32045; 021102119)

作者简介: 黎真(1979-), 女, 浙江金华人, 硕士, 主要从事分子遗传与动物育种研究

* 通讯作者: 傅衍, Tel: 0571-87951020; E-mail: fuyan@sun.zju.edu.cn

海 BIOASIA 公司; pUC19DNA/*Msp* I (*Hpa*II) Marker, 23 (26-501 bp) 购自上海 Sangon 公司; 测序反应在浙江大学分析测试中心生物大分子研究室完成。

1.3 试验方法

1.3.1 引物设计 参考 GenBank 上报道的猪 Myostatin(AF188638)、鸡 Myostatin(AF019261) 成熟区段的 cDNA 序列, 分别设计引物; 由于尚未见到鸭 Myostatin 成熟区段 cDNA 序列的报道, 故试验应用了鸡 Myostatin 的引物序列。

Pig P1: 5' CCGAATTCGATTTTGGACTCGACTGTGATG 3'

Pig P2: 5' TTGCGGCCGCTTATGAGCACCCA-CAGCGATCTAC 3'

Chicken、duck P1: 5' CAGAATTCGG-CAGAGATTTTGGCCTTGAC 3'

Chicken、duck P2: 5' TTGCGGCCGCTTATGAGCACCCGCAACGATCTAC 3'

1.3.2 PCR 反应体系和条件见表 1。

表 1 PCR 反应体系和条件

Table 1 PCR conditions

PCR 成分	用量/ μ L
MillQ H ₂ O(猪/鸡/鸭)	20.01/22.91/22.91
10 \times buffer	3
25 mmol/L MgCl ₂	2.1
10 mmol/L dNTP	0.3
10 μ mol/L P1	0.72
10 μ mol/L P2	0.72
<i>Taq</i> 酶(5 U/ μ L)	0.15
模板 DNA(猪/鸡/鸭)	3/0.1/0.1
矿物油	30
总体积	60

PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 1 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.3 克隆测序 将 PCR 产物与 pUCm-T vector 于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化 DH5 α 感受态细胞, 接着涂含有 Amp(氨苄青霉素)的筛选平板, 37 $^{\circ}$ C 放置 12~16 h, 挑白斑, 接种培养, 再用菌液 PCR(以菌液直接为模板, 其它成分同 PCR 反应体系)初步鉴定, 再抽提质粒进行质粒 PCR 及酶切鉴定, 最后用 pUCm-T vector 的通用引物 M13 进行测序。

2 结果

2.1 PCR 产物

根据 GenBank 中登录的序列推算, 设计的引物扩增的目的片段长度猪应为 348 bp, 鸡和鸭均应为 354 bp, 实际扩增的长度均与预测的相符。见图 2。

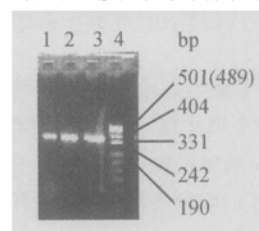


图 2 PCR 扩增产物

Fig. 2 The PCR products of Myostatin

1. 鸡 Myostatin 目的片段(354 bp);
2. 鸭 Myostatin 目的片段(354 bp);
3. 猪 Myostatin 目的片段(348 bp);
4. Marker(147~501 bp)。

2.2 酶切图谱

对克隆所得的猪、鸡 Myostatin 重组子用 *Eco*R I 和 *Not* I (缓冲液 10 \times O⁺ Buffer) 进行双酶切。由于鸭 Myostatin 成熟区 DNA 内部存在 *Eco*R I 位点, 故本试验用 pUCm-T 载体上的限制酶切位点 *Sac* I 和 *Hind* III(缓冲液 10 \times Y⁺/TANGOTM Buffer) 酶切重组子, 3 者均切出目的片段, 见图 3。

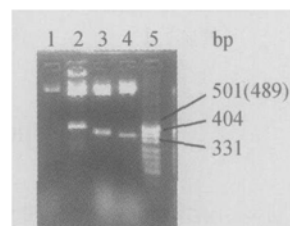


图 3 重组子的酶切鉴定

Fig. 3 The identification of recombinants by enzyme digestion

1. 空载体 pUCm-T; 2. 鸭酶切片段;
3. 鸡酶切片段; 4. 猪酶切片段; 5. Marker

2.3 序列分析

将金华猪、仙居鸡和绍鸭的 Myostatin 序列与 GenBank 中发表的猪、鸡以及其它物种(牛、鱼、山羊、鹅、兔子、家鼠、马、人、猴、鸽子、老鼠、绵羊和火鸡)的相应序列进行比较分析。

发现金华猪的序列与 GenBank 中报道的猪的

相应序列(AF188638)同源性为 99.7%,只有 1 个碱基不同,即第 261 位碱基由 T 变为 A(编码的氨基酸由 Phe 变为 Leu);仙居鸡的测序结果与 GenBank 中报道的鸡的相应序列(AF019261)同源性为 99.4%,只有 2 个碱基不同,即第 218 位碱基由 T 变为 C(编码的氨基酸没有变,均是 Gly),第 219 位碱基由 C 变为 T(编码的氨基酸由 Pro 变为 Ser);鸭 Myostatin 成熟区的 DNA 序列在 GenBank 上还未见报道。另外通过比对还发现,所有物种的 Myostatin 成熟区均含有 9 个半胱氨酸残基,而且位置均在第 6、15、16、43、47、73、74、106 和 108 位。

2.4 同源性比较

用 DNAMAN 分析软件对试验测出的金华猪、仙居鸡和绍鸭 3 个序列及 GenBank 上登录的猪、鸡以及其它物种的 Myostatin 成熟区 cDNA 序列进行同源性分析,得出表 2。

表 2 金华猪、仙居鸡、绍鸭与其它物种的同源性

Table 2 The homology of nucleotide in Jinhua pig, Xianju chicken, Shao duck and other species %

	Chicken	Cow	Fish	Goat	Goose	Hare	House mouse	Horse	Human
PigM	86	93	76	93	87	93	90	97	95
ChiM	99	83	74	84	92	84	85	86	86
DM	91	82	73	81	95	83	83	85	84

	Morkey	Pig	Pigeon	Rat	Sheep	Turkey	PigM	ChiM	DM
PigM	95	99	86	89	89	87	—	86	85
ChiM	87	86	93	85	85	97	86	—	92
DM	84	85	90	81	81	92	85	92	—

从表 2 可以看出,GenBank 上的物种与金华猪(PigM)相比,具有较高同源性的有 Pig(99%)、Horse(97%)、Human(95%)、Monkey(95%)、Cow(93%)、Goat(93%)、Hare(93%)和 House mouse(90%);与仙居鸡(ChiM)相比,具有较高同源性的有 Chicken(99%)、Turkey(97%)、Pigeon(93%)、Goose(92%)和 DM(92%);与绍鸭(DM)相比,具有较高同源性的有 Goose(95%)、Turkey(92%)、ChiM(92%)、Chicken(91%)和 Pigeon(90%)。

2.5 系统进化树

利用 Clustal W 软件分析了金华猪、仙居鸡、绍鸭及其它物种之间的进化关系,并构建了各物种的

系统进化树,见图 4。

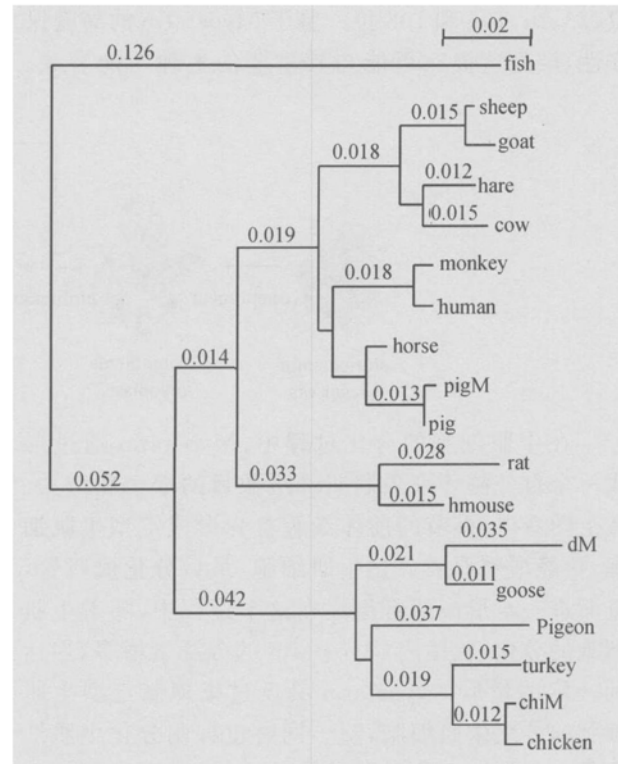


图 4 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree

数字代表枝长

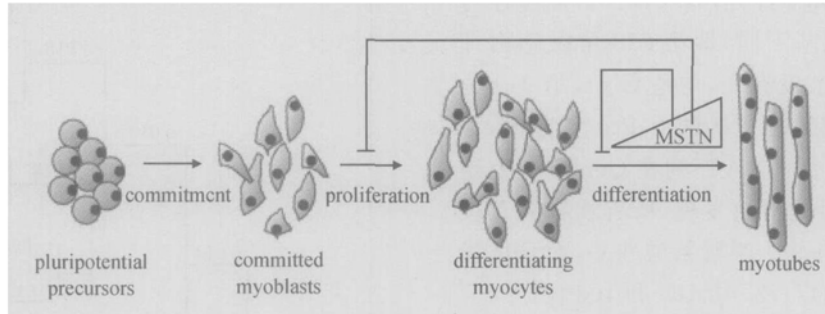
The numbers in the tree are the branch lengths

3 讨论

3.1 本研究得出的金华猪 Myostatin 成熟区 DNA 序列与 GenBank 上登录的猪相应序列比较,其中有 1 个碱基发生了突变($T^{261} \rightarrow A^{261}$),导致了编码的氨基酸由 Phe 变为 Leu,可能会引起蛋白质构象的变化。仙居鸡序列与 GenBank 上发表的鸡序列相比,也存在 2 处碱基的突变,其中 1 个($T^{218} \rightarrow C^{218}$)为无义突变,另 1 个突变($C^{219} \rightarrow T^{219}$)导致所编码的 Pro 变成了 Ser,Pro 对于蛋白质二级结构中的转角至关重要,故此突变很可能会引起蛋白质构象的变化,进而影响蛋白质的最终生物活性。鸭的序列在 GenBank 中还未见报道,故无从比较绍鸭序列的变异性。

3.2 由同源性分析结果可以看出,Myostatin 在不同物种之间具有高度的保守性,DNA 同源性均在 81% 以上(除鱼外),而且对 Myostatin 蛋白的空间折叠具有决定意义的 C 末端的“半胱氨酸结”结构在所有物种间也都完全保守,在所有物种间,均存在

9个半胱氨酸残基,而且位置均在第6、15、16、43、47、73、74、106和108位。鉴于Myostatin的高度保守性,推测这极有可能与其重要的生理功能有关。



在生肌细胞的分化过程中,Myostatin通过形成一个自分泌环来限制肌纤维数目的增多和增大。从上图看出,多节的前体细胞首先形成定型生肌细胞,再经增殖形成分化生肌细胞,最后分化成肌管,进而进一步形成肌纤维。在这个过程中,随着生肌细胞的分化,肌体内Myostatin的分泌量增多,当达到一定的量后,Myostatin又反过来抑制定型生肌细胞向分化生肌细胞转化,同时也抑制分化生肌细胞进一步向肌管分化,从而影响肌纤维的数量和直径。

3.3 系统进化树显示,各物种主要分为两大支,一大支是鱼类,另一大支是哺乳类和鸟类。在哺乳类和鸟类这一大支中又可以分为哺乳类、鸟类这两分支,在哺乳类这一分支下又分为食草类(sheep、goat、hare和cow)和杂食类(monkey、human、horse、pig、rat和house mouse)。鸟类这一分支下也可分为水禽类(duck和goose)和陆禽类(pigeon、turkey和chicken)。哺乳类中,sheep和goat均属偶蹄目中的牛科,归为一小支,sheep、goat、hare和cow同属反刍动物,划为一类;monkey和human均属灵长目,rat和house mouse均属啮齿目,因此它们各归为一小支。鸟类中,duck和goose同属雁形目中的鸭科,划为一小支;chicken和turkey均属鸡形目,遗传上最相近,接着再与鸽形目的pigeon归为一簇。该树反映的各物种之间的遗传关系与传统的分类大致上一致,然而也存在两个疑点,首先是食草类中的cow和hare,在传统分类上,cow和sheep、goat同属偶蹄目中的牛科,而hare属于兔形目,依照传统分类cow和sheep、goat的关系应该比hare更相近,而该树反映出cow和hare之间的遗传距离比cow和sheep、goat还要近,对于这点,还有待于进一步考证。其次是杂食类中的horse和pig,

Myostatin在骨骼肌生长发育过程中具有重要的负调控效应,有人提出了以下的一个作用模型^[3]:

传统分类上,horse属于奇蹄目中的马科,pig属于偶蹄目中的猪科,两者应该存在较大的区别,而该树显示horse和pig遗传距离十分相近,对此,我们推测可能存在以下原因:horse的祖先野马与pig的祖先野猪有很大的相似性,它们都是擅长奔跑的动物,肌肉都特别地发达,这是为了适应它们的生存环境,是长期自然选择的结果。因此它们肌体内影响肌肉发育的因子就显得尤为重要,而Myostatin正是影响肌肉生长发育的重要负调控因子,故有可能在野马和野猪中,Myostatin就有着很高的同源性,之后在二者各自的进化过程中,为了自身的生存发展,需要保持发达强健的肌肉,在野马和野猪进一步进化时,在较大的选择压力下,可能有利于野马、野猪生存的Myostatin基因型得以保留,而那些不适应其生存的突变在进化中被淘汰,导致在野马和野猪中被保留的Myostatin基因型较相近,因此该研究得出了horse和pig在遗传上非常相近的结果。然而功能基因反映的进化关系不是特别的准确,因之不是随机变异,要经受选择的压力。因此要对各物种进行准确地分类,今后还可以通过分析高度保守的16s rRNA基因^[4](用于远缘物种的分析,如种间亲缘关系的分析)及高度变异的mtDNA D-Loop区^[5](用于近缘物种的分析,特别是种内亲缘关系的分析)来进一步验证,这两者在进化中均没有经受选择压力,能够较好地反映各物种间的进化关系。

参考文献:

- [1] McPherron A C, Aleandra C, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member[J]. Nature, 1997, 387: 83~ 90.
- [2] Cheifetz S. The transforming growth factor- β system, a complex pattern of cross-reactive ligands and recep

- tors[J]. Cell, 1987, 48: 409~ 415.
- [3] Rios R, Carneiro I, Arce V M, et al. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 282(5): 993~ 999.
- [4] Sota T, Vogler A P. Incongruence of mitochondrial and nuclear gene trees in the Carabid beetles Ohomopterus[J]. Syst Biol, 2001, 50(1): 39~ 59.
- [5] Yang Y H, Kim K I, Cothran E G, et al. Genetic diversity of Cheju horses (Equus caballus) determined by using mitochondrial DNA D-loop polymorphism [J]. Biochem Genet, 2002, 40(5-6): 175~ 186.

Molecular Cloning and Homology Analyzing of the Mature Region DNA for Myostatin in Pig, Chicken and Duck

LI Zhen¹, NIU Dong², RUAN Hui², FU Yan^{2*}

(1. School of Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

2. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The mature region DNA for Myostatin in Jinhua pig, Xianju chicken, Shao duck were cloned and sequenced. Comparing with the corresponding species' sequence that reported in GenBank, we found that there had one base mutation($T^{261} \rightarrow A^{261}$) in Jinhua pig and two base mutation($T^{218} \rightarrow C^{218}$, $C^{219} \rightarrow T^{219}$) in Xianju chicken. The duck's sequence has not been reported in GenBank. We analyzed the homology of the sequences in all species. The results showed that Myostatin has highly conservation of heredity. The homologies in DNA level are all above 81% (except fish). We also discussed the possible Myostatin signaling pathway and the evolution relationship between all species.

Key words: pig; chicken; duck; Myostatin; homology analysis

* Corresponding author

《中国奶牛》杂志征稿启事

《中国奶牛》是由农业部主管,中国奶业协会主办、中国农业科学院畜牧研究所协办的全国性、综合性技术类期刊,国内外公开发行。刊号为 CN11-3009/S,ISSN 1004-4264。为全国中文核心期刊。

- 办刊宗旨:** ①宣传国家有关奶业的政策法规;
②报道奶业研究的新进展与成果;
③传播奶业产业化和奶牛养殖业的实用技术;
④介绍国内外奶业科技信息与动态;
⑤简介成功企业的经营理念及有关新产品。

读者对象: 奶业管理者与生产者、专业技术人员、科研人员及奶牛养殖户。

栏目设置: 奶业要闻、科学研究、饲料与饲养、繁殖育种、奶牛保健、乳品加工、机械设施、全国奶业动态、世界奶业、信息服务等。

- 投稿要求:** ①研究论文要求有中、英文摘要、关键词、英文题目和地址; ②第一作者个人简历;
③若与基金项目有关,请注明项目编号; ④请作者注明电话以便联系。

地 址: 北京德外清河南镇奶牛中心院内《中国奶牛》编辑部(100085)

电 话: 010-62948051, 82413250, 62943084(传真)

E-mail: zgnn@dac.com.cn