

东北马鹿 Myostatin 基因编码序列的克隆及序列分析^{*}

巴恒星, 邢秀梅, 李春义, 杨福合^{**}

中国农业科学院特产研究所, 吉林 132109

摘 要: 根据 Myostatin 基因的保守性, 选择牛(Bos taurus cattle 登录号:AB076403)的 Myostatin 序列为模板进行引物设计, 首次从东北马鹿基因组中扩增出 Myostatin 序列, 扩增产物连接 pMD18-T 载体, 克隆出 3 个外显子片段。根据 5'-GU-AG-3' 规则和同源基因比对拼接出完整的编码序列, 全长为 1 128 bp (发表到 GenBank 登录号: EF629535), Myostatin 蛋白前体由 375 个氨基酸组成。同源比较结果表明: Myostatin 在进化过程中具有高度保守性, 东北马鹿与猪 Myostatin 编码序列同源性最高达到 98%, 鸟类与哺乳动物间 Myostatin 编码序列同源性为 85%~89%, 鱼类与其他动物间编码序列同源性为 60%~67%。Myostatin 编码序列能够真实反映远缘物种的进化关系, 可以作为远缘物种进化分析较理想的标记。

关键词: 东北马鹿; Myostatin; 基因克隆; 同源性分析

中图分类号: Q785; S825.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2010)02-0200-05

Cloning and Sequence Analysis of Exon of Dongbei Wapiti Myostatin Gene

BA Heng-xing, XING Xiu-mei, LI Chun-yi, YANG Fu-he

Institute of Special Economic Animal and Plant, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin 132109, China

Abstract: Three exon fragments of the Myostatin sequence of Dongbei wapiti were cloned from the latest species of cattle (Bos taurus cattle accession: AB076403) for the templates, with primer's design according to the conservative of Myostatin sequence. Dongbei wapiti Myostatin was amplified for the first time. The products of PCR were linked into pMD18-T vector and then three exons were cloned. Myostatin code sequence was spliced according to 5'-GU-AG-3' rules and homologous matching. The Myostatin gene code sequence was composed of 1 128 bp (Dongbei wapiti accession: EF629535) coding 375 amino acids. The results showed that the homology analysis of the Myostatin in the evolution was highly conservative. The homology of Dongbei wapiti Myostatin amino acid sequence with pig was up to 98%; the homology of Myostatin amino acid sequence was 85%—89% between birds and mammals; the homology of Myostatin amino acid sequence was 60%—67% between fish and other animals. Myostatin code sequence could really attest to the evolution of distant species, as a better Phylogenetic mark.

Key words: Dongbei wapiti; Myostatin; gene cloning; homology analysis

我国东北马鹿(Dongbei wapiti)的产肉率很高,合理开发利用有很大生产潜力,可以培育肉茸

兼用的鹿品系,从而使生茸和产肉都能得到好的利用^[1]。

^{*} 基金项目:公益性行业(农业)科研专项基金项目(200903014)

作者简介:巴恒星,男,硕士,助理研究员,主要从事野生动物保护与利用。

收稿日期:2009-04-08 修回日期:2009-07-29

^{**} 通讯作者

1997 年,McPherron 等^[2]首先在小鼠的骨骼肌中克隆了肌生成抑素(Myostatin),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 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,其他组织器官均正常。通过蛋白质同源性比较证明,Myostatin 是 TGF- β 超家族的新成员,但不属于已发现的亚家族。进一步的研究发现,Myostatin 对骨骼肌生长具有重要的调节作用^[2-3]。Myostatin 序列在进化过程中高度保守,McPherron 等^[2]从人、鼠、牛、羊、猪、鸡、狒狒等的组织提取物建立了 cDNA 文库,用鼠抗 Myostatin C-端保守区的探针筛查发现,Myostatin 在不同种属间高度保守。事实上,在研究过的几乎所有的哺乳动物及鸟类、禽类中,Myostatin 分子活性部位的蛋白质序列都一致。另外,与 TGF- β 超家族的其他成员一样,Myostatin 也是先合成前体蛋白质(52 kD),由信号肽、编码前肽(26 kD)的 N-末端区和编码成熟肽(12.5 kD)的 C-末端区 3 部分组成,在 N-末端区和 C-末端区之间有一个蛋白酶加工位点。Myostatin 与 TGF- β 超家族还有共性:在带有信号肽的 N-末端区附近有一氨基酸残基构成的疏水前体蛋白质核心;Myostatin 蛋白质中部靠 C-末端区有一个保守的蛋白酶加工信号(RSSR,263~266);C-末端区有 9 个半胱氨酸残基形成“Cys Knot”的结构。

本研究克隆了东北马鹿 Myostatin 3 个外显

子,并拼接出 Myostatin 全部编码序列,对编码序列进行同源分析比较,为通过抑制东北马鹿 Myostatin 的活性而增加肌肉量,开发肉用东北马鹿品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

东北马鹿血样(采集地点内蒙林东乌兰坝鹿场第一养鹿小区)、pMD18-T 载体、高保真 LA Taq 酶、T₄ DNA 连接酶、dNTP 等试剂购自宝生物工程有限公司(TaKaRa),大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中国农业科学院特产研究生物技术研究室培养,DNA 回收纯化、质粒提取试剂盒购于天为时代生物公司。

1.2 基因组 DNA 的提取

采东北马鹿血样,使用传统的酚/氯仿/异戊醇方法抽提基因组 DNA,TE 溶解后 -20 保存。

1.3 引物的设计

依据牛(Bos taurus cattle 序列号:AB076403)的 Myostatin 的 DNA 序列进行引物设计,设计 3 对引物,P1 位于序列的 58~73 bp 处,P2 位于序列的 600~621 bp 处,P3 位于序列的 2 265~2 291 bp 处,P4 位于序列的 2 738~2 751 bp 处,P5 位于序列的 4 644~4 667 bp 处,P6 位于序列的 5 209~5 234 bp 处,由北京华大测序合成。PCR 反应体系见表 1。

表 1 引物的 DNA 序列、预扩增片段长度、复性温度及扩增片段位置

Table 1. DNA sequence of primers, annealing temperature and predicted length of amplified DNA fragments, position of amplified DNA fragments

序号 No.	预扩增片段 长度/bp Length of amplified fragment	复性温度 / Annealing temperature	扩增位置 Amplified position	引物序列 Sequence of primers	
				5 端(5'end)	3 端(3'end)
P1,P2	572	52	涵盖第一外显子	GGCTTGGCGTTACTCAAAAGC	CTCCTCTTACGTACAA GCCAGCA
P3,P4	555	48	涵盖第二外显子	GTTCATAGATTGATATGGA GGTGTTTCG	ATAAGCACAGGAACTGGTAGTTAT
P5,P6	589	53	涵盖第三外显子	GAAATGTGACATAAGCAAAATGATTAG	ATACICTAGGCTTATAGCCTGTGGT

1.4 PCR 产物的回收纯化、T-载体克隆和阳性克隆筛选

扩增产物回收纯化后连接到载体 pMD18-T 上,转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中,涂布于涂有 X-gal 和 IPTG 的 LB 培养基中。挑取白斑,提取质粒,双酶切进行鉴定。

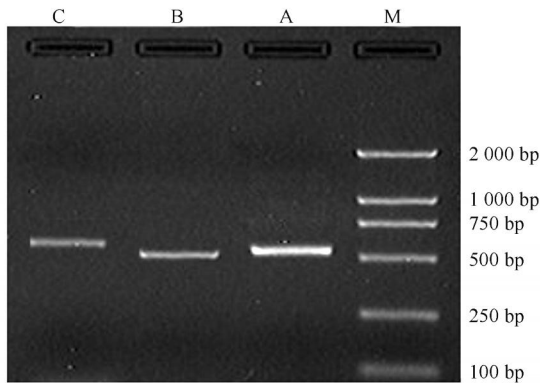
2 结 果

2.1 PCR 扩增结果

东北马鹿 Myostatin 基因 3 个外显子扩增结果图 1。

2.2 双酶切鉴定结果

东北马鹿 Myostatin 基因 3 个外显子双酶切鉴定结果见图 2。



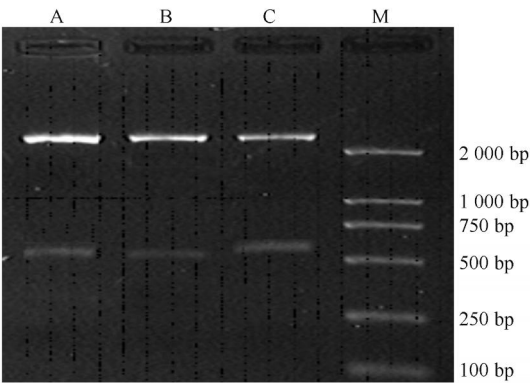
M. DL2000 bp DNA Marker; A. 第一外显子 Exon 1 of PCR products; B. 第二外显子 Exon 2 of PCR products; C. 第三外显子 Exon 3 of PCR products

图 1 东北马鹿 Myostatin 3 个外显子扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1. Electrophoresis pattern of PCR products of Dongbei wapiti Myostatin

2.3 Myostatin 编码序列的拼接

选阳性克隆送北京华大测序,将测序结果中删掉质粒载体序列后,根据5'-GU-AG-3'规则^[3]找出外显子和内含子连接的核苷酸保守序列和blastn 同源比对分析确定外显子和内含子连接处,拼接出一条部分缺失5'UTR 和3'UTR 的 cDNA,长度为1 331 bp 的序列。再进行 BlastX 分析,分析出全部编码序列长度为1 128 bp,可以翻译一条由



M. DL2000 bp DNA Marker; A. 第一外显子 Exon 1 of PCR products; B. 第二外显子 Exon 2 of PCR products; C. 第三外显子 Exon 3 of PCR products

图 2 重组质粒的 EcoR 和 Hind 双酶切鉴定结果
Fig. 2. EcoR and Hind endonuclease digestion of reconstructed plasmid

375个氨基酸组成的蛋白质序列。其中第一外显子编码碱基数目为373 bp,第二外显子编码碱基数目为374 bp,第三外显子编码碱基数目为381 bp。

2.4 Myostatin 同源性比较

应用 DNAMAN 和 Cluster X 软件,对东北马鹿和 GenBank 上的其他 18 种动物的 Myostatin 编码序列进行遗传距离和同源性分析(表 2),并翻译成氨基酸后进行同源比对。

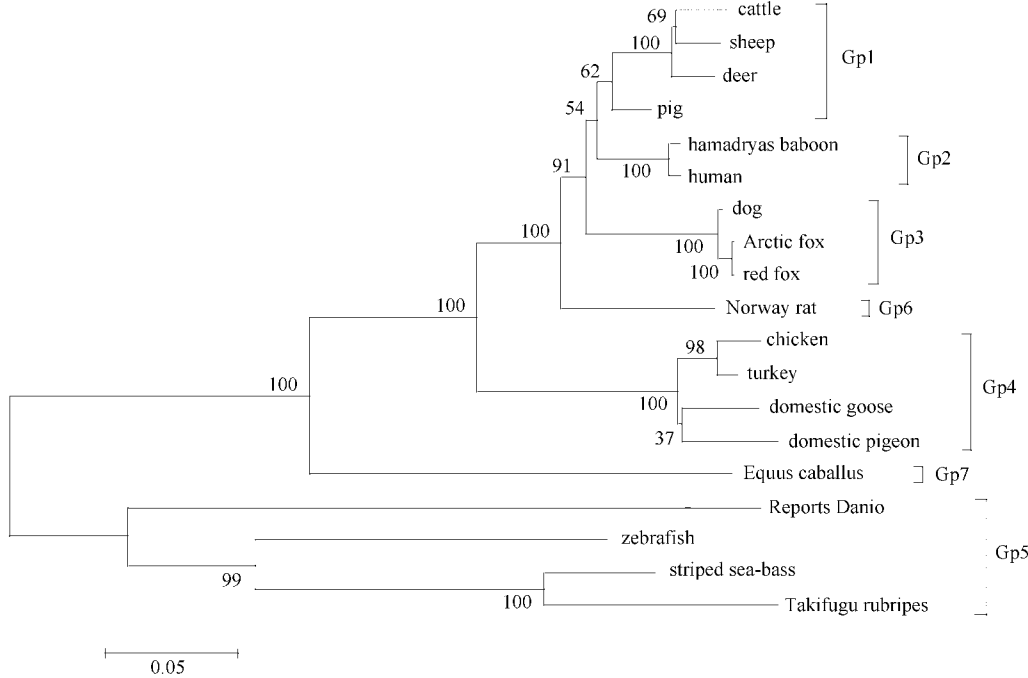


图 3 Myostatin 编码序列系统进化树

Fig. 3. Myostatin coding sequence system

表 2 Myostatin 同源性比较结果
Table 2. Result of homology comparison

动物名称 Animal name	斑马鱼 Zebrafish	河豚 Glofish	石鲈 Danio	鲈 Takifugu rubiropes	火鸡 Turkey	鸡 Chicken	家鹅 Domestic goose	家鸽 Domestic pigeon	老鼠 Norway rat	人 Human	狒狒 Papio hamad- ryas	东北马鹿 Dongbei wapiti	牛 Cattle	羊 Sheep	猪 Pig	狗 Dog	红狐 Red fox	蓝狐 Arctic fox	马 Horse
斑马鱼 Zebrafish		76	81	68	68	68	68	67	67	68	68	67	66	66	68	67	67	67	68
河豚 Glofish	0.303		88	63	63	63	62	62	61	62	62	61	61	61	62	62	61	61	62
石鲈 Danio	0.313	0.088		64	64	65	64	64	63	64	64	63	62	63	64	64	63	63	64
鲈 Takifugu rubiropes	0.334	0.173	0.210		61	61	61	61	60	61	61	61	60	60	60	60	60	60	60
火鸡 Turkey	0.319	0.081	0.035	0.206		99	97	97	90	92	92	89	88	88	91	90	90	90	91
鸡 Chicken	0.303	0.097	0.124	0.201	0.122		97	96	90	92	91	89	88	88	91	90	89	89	91
家鹅 Domestic goose	0.338	0.163	0.199	0.025	0.193	0.197		96	89	91	90	88	87	87	90	88	88	88	90
家鸽 Domestic pigeon	0.506	0.481	0.489	0.473	0.489	0.497	0.490		89	91	91	88	87	87	90	89	88	88	90
老鼠 Norway rat	0.304	0.008	0.086	0.172	0.080	0.100	0.162	0.474		95	95	92	91	91	95	93	93	93	95
人 Human	0.518	0.517	0.516	0.483	0.515	0.513	0.488	0.283	0.517		99	96	94	94	98	96	95	95	97
狒狒 Papio hamadryas	0.350	0.167	0.203	0.061	0.205	0.198	0.055	0.491	0.165	0.513		96	94	94	98	96	95	95	97
东北马鹿 Dongbei wapiti	0.356	0.181	0.213	0.067	0.212	0.208	0.060	0.503	0.177	0.507	0.066		95	95	97	95	94	94	96
牛 Cattle	0.307	0.091	0.093	0.211	0.095	0.122	0.198	0.491	0.091	0.503	0.207	0.211		93	95	93	93	93	95
羊 Sheep	0.508	0.569	0.572	0.536	0.562	0.556	0.537	0.328	0.569	0.130	0.569	0.561	0.556		95	93	92	92	94
猪 Pig	0.296	0.047	0.061	0.175	0.057	0.092	0.166	0.478	0.047	0.501	0.171	0.180	0.078	0.554		96	96	96	98
狗 Dog	0.308	0.095	0.099	0.210	0.101	0.126	0.196	0.497	0.095	0.511	0.207	0.210	0.007	0.564	0.085		99	99	96
红狐 Red fox	0.308	0.095	0.099	0.210	0.101	0.126	0.196	0.497	0.095	0.511	0.207	0.210	0.007	0.564	0.085	0.002		99	96
蓝狐 Arctic fox	0.564	0.547	0.552	0.556	0.544	0.543	0.543	0.431	0.547	0.435	0.559	0.561	0.536	0.460	0.548	0.540	0.538		96
马 Horse	0.300	0.079	0.035	0.210	0.035	0.120	0.200	0.479	0.080	0.513	0.209	0.215	0.093	0.565	0.055	0.099	0.099	0.540	

注：对角线上是相似百分比，对角线以下是遗传距离
Note: Percent similarity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of Myostatin

2.5 Myostatin 进化树

用 MEGA3.1 以 Kimura 2-parameter 模型,建立 NJ 树,并对拓扑图进行了自展检验(bootstrap),重复抽样次数为 1 000 次,置信度除了一个 37%,其他的都大于 50%,有 11 个达 100%,置信度很高(图 3)。每个位点上的核苷酸替换用 Kimura's 2-parameter method(v) 估计。置信值(Bootstrap)来自 1 000 个复制序列的统计。

3 讨 论

本研究再一次成功证明了通过异种同源基因克隆的可行性,对鹿类动物 Myostatin 一无所知的情况下,利用 GenBank 中已有的与鹿类动物进化关系最近的牛(*Bos taurus cattle* 序列号:AB076403)的 Myostatin DNA 序列进行引物设计,通过 PCR 扩增成功得到了东北马鹿的 Myostatin 全部编码序列,具有操作简单、耗时短、投入少等优势,是一种简便、快速的方法。

Myostatin 编码序列同源分析表明:各种哺乳动物同源性平均达到 94%以上,东北马鹿与猪的同源性最高达到 98%,东北马鹿与鸟类间同源性为 85%~89%,东北马鹿与鱼类间同源性为 60%~67%,这说明哺乳动物的 Myostatin 进化十分保守。Myostatin 属于 TGF- β 超家族成员,共有的结构特点是 C 末端有保守的蛋白酶水解位点 RRSR,前体蛋白通过该位点被蛋白酶水解后形成有生物活性的蛋白^[2]。19 种动物 Myostatin 的氨基酸序列比对结果表明:在 C 末端氨基酸序列第 263~266 之间除了几种鱼类都出现了保守的蛋白质酶切位点 RRSR,几种鱼类 264 位点的 S 被 A、V、I 所替代。这几种氨基酸的 R 侧链性质差不多,可能是进化的原因导致位点产生了变异,但水解酶仍然能够辨认该位点,因此不影响前导肽被切除,蛋白质的生物活性仍然可以正常表现。氨基酸序列第 298 位以后出现更加保守区,恰恰是水解位点后的蛋白质成熟区域,即使有一些突变,也是理化性质相近的氨基酸之间的变化。对不同物种间的同源蛋白质的生物活性几乎没有影响。对空间结构起决定作用的半胱氨酸位点相当保

守,C 末端形成了 9 个半胱氨酸的“半胱氨酸节点”,特别是 19 种动物除了少数鱼类最后 9 个氨基酸完全一致外,推测这些位点与其重要的生理功能有关。

进化分析结果表明:鹿与牛、羊都属于偶蹄目且都是反刍动物,同时与偶蹄目猪亲缘关系比较近(Qp1),归为一类;人和狨猴都属于灵长目(Qp2),亲缘关系比较近,归为一类;狗、狐狸都属于犬科(Qp3),亲缘关系较近,归为一类;鹅、火鸡、鸡和家鸽都属于禽类(Qp4),亲缘关系较近,归为一类;鱼类(Qp5)的亲缘关系较近,归为一类,但与其他动物之间亲缘关系较远。鼠(Qp6)属于鼠科、马(Qp7)属于马科,各归一类。Myostatin 属于功能基因,由于受到选择的压力而在进化上相当保守^[4],特别是水解加工位点后的成熟区段,也是功能区段更加保守,因而与远缘关系的鱼类同源性也比较高。在选择压力下,外显子序列与内含子和 mtDNA 相比,进化速度最慢^[5-7]。进化分析结果表明 Myostatin 的编码序列的进化与物种的进化关系一致。对远源物种的分析,如对种间亲缘关系的分析真实性强,可信度高。Myostatin 的编码序列可作为远缘物种进化分析较理想的标记。

参考文献:

- [1] 崔光范,李和平. 北方经济动物养殖实用技术[M]. 呼和浩特:内蒙古科学技术出版社,2003.
- [2] McPherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member[J]. *Nature*, 1997, 387(6628): 83-90.
- [3] 张玉静. 分子遗传学[M]. 北京:科学出版社,2005:184-194.
- [4] Liss M, Kirk D L, Beyser K, Fabry S. Intron sequences provide a tool for high resolution phylogenetic analysis of volvocine algae[J]. *Curr Genet*, 1997, 31(3): 214-227.
- [5] Hedin M C, Maddison W P. Phylogenetic utility and evidence for multiple copies of elongation factor-1 α in the spider genus *Habronattus* (Araneae: Salticidae) [J]. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(8): 1512-1521.
- [6] 黎真,牛冬,阮晖,等. 猪、鸡、鸭 Myostatin 成熟区段 DNA 的克隆及其同源性分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(4): 323-327.
- [7] 邢秀梅,杨福合,苏伟林,等. 马鹿线粒体 DNA 序列多态性分析[J]. *吉林农业大学学报*, 2006, 28(3): 325-329.