

大黄鱼肌肉生长抑制素 1 型和 2 型基因时空表达分析

薛良义* 孙 升

(宁波大学生命科学与生物工程学院, 宁波 315211)

摘要 肌肉生长抑制素(MSTN)是动物肌肉生长发育重要的负调控因子。大黄鱼存在两种类型的肌肉生长抑制素基因, 利用 RT-PCR 技术, 本文对这两个基因在胚胎发育过程和成体鱼中的组织特异性表达进行了分析。在 6 月龄和 18 月龄大黄鱼中, *MSTN-1* 和 -2 均在多种组织表达, 但肌肉组织中只有 *MSTN-1* 表达。在胚胎发育过程中, *MSTN-1* 在囊胚期前表达, 在原肠胚期未检出, 到出膜期又开始表达, 而 *MSTN-2* 在整个胚胎发育期均未检出。结果提示, 无论在成鱼还是在胚胎发育过程中, 两种类型的 *MSTN* 具有不同的表达调控机制。

关键词 大黄鱼; 肌肉生长抑制素基因; 时空表达

McPherron 等^[1]于 1997 年首先从小鼠骨骼肌中分离到肌肉生长抑制素基因(*myostatin*, *MSTN*), 敲除该基因, 小鼠骨骼肌重量明显增加, 是正常小鼠的 2~3 倍。基因突变导致 *MSTN* 功能丧失的比利时蓝牛肌肉发达, 出现“双肌”表型^[2]。因此该基因引起了众多研究者的兴趣, 至今已克隆了多种动物的 *MSTN* 基因, 包括人、家养动物和鱼类等^[3]。与高等脊椎动物一样, 抑制 *MSTN* 的功能, 可以促进鱼类的生长^[4], 甚至产生双肌型的斑马鱼^[5]。

与哺乳动物不同的是, 近年来发现斑马鱼、大西洋鲑等鱼类存在两种类型的 *MSTN*, 即 1 型和 2 型^[6,7]。除了基因序列上的差别, 它们的组织特异性表达也不一样, 表明这两种基因可能具有不同的功能。但对这两种基因特异性表达的研究大多局限于成年鱼, 对其在胚胎发育中表达差异的研究不多。为此, 作者在克隆大黄鱼 *MSTN-1* 和 -2 基因的基础上^[8,9], 对这两种基因在大黄鱼胚胎发育过程和成体鱼中的组织特异性表达进行了比较。

1 材料与方法

1.1 样品采集

大黄鱼及其胚胎均取自宁波海湾水产苗种繁育中心。从 6 月龄及 18 月龄大黄鱼中分别取以下 10 个组织和器官样品: 骨骼肌、脂肪组织、肝、肠、眼、鳃、肾、脑、心脏和脾等, 分装于 1.5 ml 离心管, 并迅速置于液氮罐中带回实验室, -80℃ 保存备用。

分别采集大黄鱼 0、3、6、9、15、21 及 27 hpf (hours post fertilization) 的胚胎、仔鱼(第 10 和

20 日龄)及稚鱼(第 30 日龄), 装于 1.5 ml 离心管, 处理与组织样品相同。其中第 3、6、9、15、21 及 27 hpf 时大黄鱼的胚胎分别处于多细胞期、囊胚期、原肠胚期、肌节形成期、心跳期及出膜期。

1.2 基因表达的 RT-PCR 检测

1.2.1 总 RNA 提取 取 50 mg 样品提取总 RNA, 方法参照 Trizol 试剂说明书(上海生工)。提取的总 RNA 于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检测其完整性。

1.2.2 cDNA 第一链的合成 cDNA 第一链的合成使用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(大连宝生物工程有限公司), 反应体系如下: Oligo dT Primer(50 μmol/L) 1 μl, dNTP Mixture(10 mmol/L each) 1 μl, Total RNA 1 μg, 加 H₂O 至 10 μl。65℃ 变性 5 min, 迅速置于冰上退火 2 min。在上述反应液中加 5×PrimeScript™ Buffer 4 μl, RNase Inhibitor (40 U/μl) 0.5 μl, PrimeScript™ RTase(200 U/μl) 1 μl, H₂O 4.5 μl。42℃ 60 min 及 70℃ 15 min, 置于 -20℃ 保存。

1.2.3 扩增 *MSTN-1* 和 -2 特异性引物设计 扩增 *MSTN-1* 的引物为 Myo1F: 5'-TCC CTG AAG ATC GAC GTG AA-3' 和 Myo1R: 5'-TTT GGG GCA ATA ATC CAG TC-3', 预期扩增片段为 335 bp, 跨内含子 2 区域。扩增 *MSTN-2* 的引物为 Myo2F: 5'-CCA TAG TAT CAA GTC CCA GAT CC-3' 和 Myo2R: 5'-TGA ACA GGC AGC AGG AGG ACA AC-3', 预期扩增片段为 233 bp, 跨内含子 1 区域。内参物为 *β-actin*, 引

收稿日期: 2010-09-02 接受日期: 2010-10-13

国家自然科学基金(No.30871916)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0574-87600165, E-mail: xueliangyi@nbu.edu.cn

物为BactinF: 5'-CCA GAT CAT GTT CGA GAC CTT C-3' 和 BactinR: 5'-GAA CCT CTC ATT GCC AAT GGT G-3', 预期扩增片段为 406 bp。

1.2.4 *MSTN*-1 和 -2 表达检测 PCR 反应体系: $MgCl_2$ 1.5 mmol/L, cDNA 1.0 μ l, dNTP(各2.5 mmol/L) 2 μ l, 正反向引物(20 μ mol/L)各0.5 μ l, *Taq* 酶1U, 反应总体积 25.0 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 40 个循环 (94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s), 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增 *MSTN*-1、-2 和 β -actin 的退火温度分别为 56 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C 和 58 $^{\circ}$ C。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 *MSTN*-1 和 -2 在 6 月龄大黄鱼不同组织中的表达

6 月龄大黄鱼, 在肌肉、肝、肠、眼、鳃、肾、脂肪、脑和脾等 9 个组织和器官中均检测到 *MSTN*-1 的表达, 但在心脏未检出, 其中表达量较高的为肌肉、肠、脂肪、脑和脾, 其次为肝、眼、鳃和肾。*MSTN*-2 在肝、肠、眼、鳃、肾、脂肪、脑和脾中表达, 在肌肉和心脏中未检测到表达, 其中表达量较高的为

脂肪和脑, 其次为肠, 表达量较少的为肝、眼、鳃和肾(图 1)。

2.2 *MSTN*-1 和 -2 在 18 月龄大黄鱼不同组织中的表达

18 月龄大黄鱼, *MSTN*-1 在肌肉、肠、眼、鳃、脂肪和脑等 6 个组织中表达, 在肝、肾脏、心脏和脾脏中未检测到表达, 其中表达量较高的为肌肉、眼、脂肪和脑, 其次为鳃, 微量表达的为肠。*MSTN*-2 在肠、眼、鳃、脂肪、脑和脾等 6 个组织中表达, 在肌肉、肝、肾和心脏中未检测到表达, 其中表达量较高的为脂肪和脑, 其次为肠、眼和脾, 微量表达的为鳃(图 2)。

2.3 *MSTN*-1 和 -2 在大黄鱼个体发育早期的表达

在大黄鱼个体发育过程中, *MSTN*-1 分别在第 0、3、6、27 hpf 的胚胎和 10、20 和 30 日龄的仔、稚鱼中表达, 在 9、15 和 21 hpf 期并未检测到表达, 其中在 3 hpf 胚胎以及 20 和 30 日龄的仔、稚鱼中有较高的表达。*MSTN*-2 在大黄鱼个体发育早期未检测到明显的表达(图 3)。



Fig.1 The expression pattern of *MSTN*-1 and -2 in the tissues of 6-month old *Pseudosciaena crocea*

A: *MSTN*-1; B: *MSTN*-2; C: β -actin. Lines from 1 to 10 represent skeletal muscle, liver, intestine, eye, gill, kidney, adipose, brain, heart and spleen, respectively. NTC shows negative control.

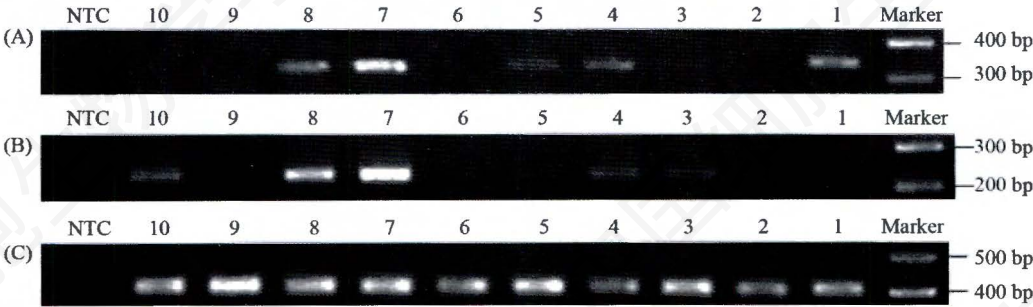


Fig. 2 The expression pattern of *MSTN*-1 and -2 in the tissues of 18-month old *Pseudosciaena crocea*

A: *MSTN*-1; B: *MSTN*-2; C: β -actin. Lines from 1 to 10 represent skeletal muscle, liver, intestine, eye, gill, kidney, adipose, brain, heart and spleen, respectively. NTC shows negative control.

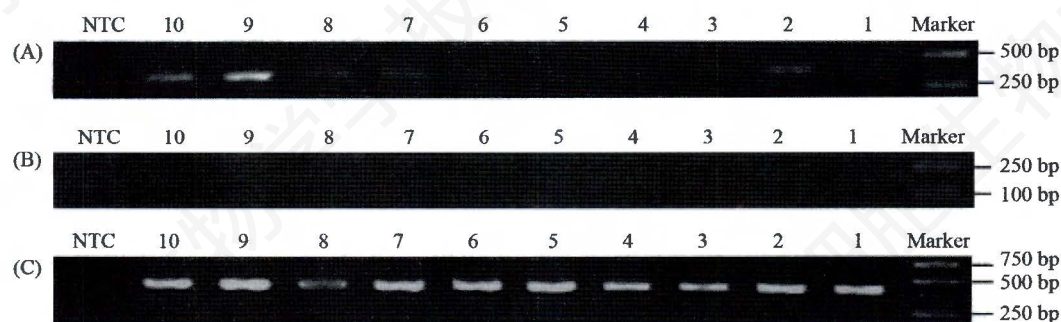


Fig.3 The expression pattern of *MSTN*-1 and -2 in the early developmental stage of *Pseudosciaena crocea*

A: *MSTN*-1; B: *MSTN*-2; C: β -actin. Lines from 1 to 10 represent 0 hpf, 3 hpf, 6 hpf, 9 hpf, 15 hpf, 21 hpf, 27 hpf, 10th day, 20th day and 30th day larval fish, respectively. NTC shows negative control.

3 讨论

迄今为止,在哺乳动物中只发现1种类型的*MSTN*,但部分硬骨鱼类在进化过程中基因组经历了一次复制^[10],从而产生了两种类型的*MSTN*。

作者以前的工作表明大黄鱼两种类型*MSTN*基因在序列上存在一定差异^[9],本研究表明它们在时空表达方面也存在差异。6月龄大黄鱼是生长较快的时期,这一时期,*MSTN*-1在肌肉、肠、脂肪、脑和脾等组织表达较强,而*MSTN*-2在脂肪、脑和肠表达较强;在接近性成熟的18月龄大黄鱼中,*MSTN*-1在肌肉、脂肪和脑等组织表达较强,而*MSTN*-2在脂肪和脑表达较强。值得注意的是,无论是6月龄还是18月龄大黄鱼,肌肉组织中均未检测到*MSTN*-2的表达。这一结果与Maccatrozzo等在金鲷的工作一致,*MSTN*-1主要在肌肉、肠、肾等组织表达,而*MSTN*-2主要在脑中表达,在肌肉组织中不表达,且在1龄和2龄鱼表达图谱存在差异^[11,12]。在虹鳟中,*MSTN*更为复杂,存在4种类型,*MSTN*-1a在肌肉、肠、性腺和肾等多种组织表达,而*MSTN*-2a主要在脑中表达^[13,14]。Helterline等^[6]利用Real-Time PCR技术发现*MSTN*-2主要在斑马鱼的脑、眼等组织表达,同时也检测到在肌肉组织中有微量的表达。可见,不同的鱼类,不同的生长发育阶段,*MSTN*-1和-2的组织表达图谱存在差异,但相同的是*MSTN*-1均在肌肉组织中高度表达,而*MSTN*-2在肌肉组织中不表达或表达量极少,在脑中高度表达。这些结果表明,在进化过程中,鱼类*MSTN*-1和-2的功能产生了分歧,*MSTN*-2可能主要与中枢神经系统的功能有关,*MSTN*-1则与哺乳动物的*MSTN*较为接近,后者主要在肌肉组织中表达,调控肌肉的生长发育。

在胚胎发育过程中,*MSTN*-1从刚受精的卵(0

hpf)到多细胞期(3 hpf)表达明显增强,之后到囊胚期(6 hpf)表达开始下降,到原肠胚期(9 hpf)不能检出,在出膜期(27 hpf)又能检测到明显的表达,出膜后直到仔鱼期(10日、20日龄)、稚鱼期(30日龄)表达强度维持在一个较高的基本恒定的水平。以上结果说明了囊胚期前的*MSTN*-1 mRNA转录本来自卵细胞,是母源性的。这一结果与斑马鱼*MSTN*-1的情况相一致,斑马鱼*MSTN*-1在囊胚期表达较强,到原肠胚期下降明显,在体节发生期,表达量又明显上升^[6]。这些结果进一步说明*MSTN*-1与鱼类肌肉生长发育的调控有关。

而*MSTN*-2在整个早期发育阶段均未检测到明显的表达。由于 β -actin在这些阶段都能稳定的检测到,因此可排除是由于实验操作导致的假阴性结果。与此相似的是,金鲷的*MSTN*-2在胚胎发育早期未表达,至25天的仔鱼才开始表达,44天时表达明显增强,此时脑的发育较为完整^[12],说明*MSTN*-2的表达可能与中枢神经系统的发育和功能有关。使用Real-Time PCR方法,发现虹鳟^[14]*MSTN*-2a在个体发育早期有十分微弱的表达,但不同阶段之间无明显差异;而斑马鱼^[6]的*MSTN*-2在胚胎发育中的表达有明显的阶段型,虽然表达量远低于*MSTN*-1。这些结果说明在胚胎发育过程中,*MSTN*-1和-2的表达调控也是不一样的。

参考文献(References)

- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 1997; 87(6628): 83-90.
- McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(23): 12457-61.
- Rodgers BD, Garikipati DK. Clinical, agricultural, and evolu-

- tionary biology of myostatin: a comparative review. *Endoc Rev* 2008; 29(5): 513-34.
- 4 Lee SB, Kim YS, Oh MY, Jeong IH, Seong KB, Jin HJ. Improving rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth by treatment with a fish (*Paralichthys olivaceus*) myostatin prodomain expressed in soluble forms in *E. coli*. *Aquaculture* 2010; 302 (3-4): 270-8.
 - 5 Lee CY, Hu SY, Gong HY, Chen MH, Lu JK, Wu JL. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 387(4): 766-71.
 - 6 Helterline DL, Garikipati D, Stenkamp DL, Rodgers BD. Embryonic and tissue-specific regulation of myostatin-1 and -2 gene expression in zebrafish. *Gen Comp Endocr* 2007; 151(1): 90-7.
 - 7 Ostbye TK, Galloway TF, Nielsen C, Gabestad I, Bardal T, Anderson O. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *Eur J Biochem* 2001; 268(20): 5249-57.
 - 8 Xue L, Qian K, Qian H, Li L, Yang Q, Li M. Molecular cloning and characterization of the myostatin gene in croceine croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Mol Biol Rep* 2006; 33(2): 129-36.
 - 9 孙 升, 薛良义, 童丽娟. 大黄鱼 gdf-8 II 开放阅读框序列克隆及分析. *宁波大学学报(理工版)* 2009; 22(1): 39-43.
 - 10 Vandepoele K, De Vos W, Taylor JS, Meyer A, Peer YV. Major events in the genome evolution of vertebrates: paranome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(6): 1638-43.
 - 11 Maccatrozzo L, Bargelloni L, Radaelli G, Mascarello F, Patarnello T. Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure, and expression pattern. *Mar Biotechnol* 2001; 3(3): 224-30.
 - 12 Maccatrozzo L, Bargelloni L, Cardazzo B, Rizzo G, Patarnello T. A novel second myostatin gene is present in teleost fish. *FEBS Lett* 2001; 509(1): 36-40.
 - 13 Rescan PY, Jutel I, Ralliere C. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 2001; 204(20): 3523-9.
 - 14 Garikipati DK, Gahr SA, Roalson EH, Rodgers BD. Characterization of rainbow trout myostatin-2 genes (rtMSTN-2a and -2b): Genomic organization, differential expression, and pseudogenization. *Endocr* 2007; 148(5): 2106-15.

Temporal and Spatial Expression Analysis of *MSTN*-1 and -2 in *Pseudosciaena crocea*

Liang-Yi Xue*, Sheng Sun

(College of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Myostatin (MSTN) is an important negative regulator in animal muscle growth and development. Large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*, has two types of *MSTN* genes, *MSTN*-1 and -2. Embryonic and tissue-specific expressions of *MSTN*-1 and -2 genes were analyzed by using RT-PCR. In 6 and 18-month old fish, both *MSTN*-1 and -2 genes expressed in a wide variety of tissues. However, only *MSTN*-1 expressed in muscle tissue. In embryonic development, *MSTN*-1 expressed before blastula stage (6 hpf), and was undetected throughout gastrulation (9hpf), and rised again in hatching (27 hpf). *MSTN*-2 was undetected through embryogenesis. These results indicated that the expression of *MSTN*-1 and -2 genes was differentially regulated in both developing embryos and adult tissues of fish.

Key words *Pseudosciaena crocea*; myostatin; temporal and spacial expression

Received: September 2, 2010 Accepted: October 13, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China(No.30871916)

*Corresponding author. Tel: 86-574-87600165, E-mail: xueliangyi@nbu.edu.cn