第31卷 第5期
2007年9月

水生生物学报
ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

Vol. 31, No. 5
Sep., 2007

鲤鱼肌肉生长抑制素基因(*MSTN*)的克隆及其组织表达特征

李兴美[1] 范 巍[1] 张 彬[1] 彭 扣[1] 王玉凤[1] 胡 炜[2] 赵浩斌[1]

(1. 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079; 2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 肌肉生长抑制素(Myostatin, MSTN)是动物肌肉发育和生长过程中的负调控因子, 对MSTN的研究将有助于促进动物生产。鲤鱼是我国的主要淡水养殖对象之一。因此, 我们采用RT-PCR方法克隆了鲤鱼*MSTN* cDNA (No. EF551058)的部分序列, 长度为921bp, 编码306个氨基酸残基。鲤鱼MSTN具有MSTN的共同特征, 有蛋白酶水解位点RIRR和9个保守的半胱氨酸残基。多重序列比较发现其与斑马鱼GDF8有极近的亲缘关系, 96.7%的氨基酸序列同源。不同组织的RT-PCR分析发现鲤鱼*MSTN*主要在肌肉和脑部表达, 而其他所检测组织未见表达。鲤鱼MSTN不仅在肌肉生长发育中发挥作用, 可能在神经系统发育中也有其作用。

关键词: 鲤鱼; 肌肉生长抑制素; 克隆; 同源性; 组织表达
中图分类号: S941.51 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)05-0643-06

肌肉生长抑制素(Myostatin, MSTN), 又称生长分化因子8(Growth differentiation factor 8, GDF8), 较为保守并存在于肌肉中, 是转化生长因子β(Transforming growth factor β)超家族成员, 是肌肉生长的负调控因子[1,2]。

1997年McPherron等发现MSTN仅在小鼠胚胎和成年肌细胞中表达; *MSTN*基因敲除鼠肌肉生长旺盛, 肌纤维增生或肥大[2]。其后, Grobet等[3]、McPherron和Lee[4]分别在比利时蓝牛(Belgian Blue)和Piedmontese牛中发现了*MSTN*的自然缺失与变异, *MSTN*的缺失与变异造成这两种牛的双臀性状。MSTN的发现引起了各国科学家的广泛兴趣, 在多种动物包括人到果蝇中进行MSTN的研究。

目前已经在斑马鱼(*Danio rerio*)[4—6]、溪红点鲑(*Salvelinus fontinalis*)[7,8]、虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)[9]、银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)[7,8]、大马哈鱼(*Salmo salar*)[10]、金头鲷(*Sparus aurata*)[11,12]、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)[13]、白鲈(*Morone chrysops*)[13]、斑点叉尾 (*Ictalurus punctatus*)[14]、条纹石 (*Morone saxatilis*)[15]、白石 (*Morone americana*)[15]和石首鱼(*Umbrina cirrosa*)[16]等鱼类中克隆得到*MSTN*基因; 鱼类*MSTN*可在骨骼肌表达以外, 还可在目前报道的鱼类多个组织如肝、心、胃、鳃、卵巢、精巢、肾、肌肉、眼和脑等中表达[5—16]。用转MSTN前肽域基因[17]或Morpholino[5]和RNAi[18]等技术, 在斑马鱼中已经证实MSTN的降调节极大地促进了斑马鱼胚胎发育过程中的肌肉发育和生长, 引起肌肉增生或肥大。因此, 研究*MSTN*功能和表达调控对渔业生产有重要意义。

鲤鱼(*Cyprinus carpio*)是我国的主要淡水养殖鱼类之一, 在我国已有数百年养殖历史。生物技术也已经运用在鲤鱼上, 朱作言等自1984年就进行了鱼的转基因研究, 获得快速生长的转生长激素基因鲤鱼[19]。

MSTN作为肌肉生长发育有关的重要调控基因, 其研究无疑对了解鲤鱼生长发育的调节、生长激素促进肌肉生长的机理和通过对*MSTN*基因的调控促进鱼的生长发育有重要作用。因此, 我们克隆了鲤鱼*MSTN*部分序列(GeneBank注册号: EF551058), 包括前肽域和TGF-β功能域, 并对鲤鱼*MSTN*的组织表达特征进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料 鲤鱼购自当地水产品市场。鲜鱼购回后即进行解剖, 提取肌肉和其他各组织RNA。

收稿日期: 2005-10-26; 修订日期: 2006-12-21
基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金; 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金(2005FB18)资助
作者简介: 李兴美, 男, 湖北人; 学士; 现在华中师范大学汉口分校工作
通讯作者: 赵浩斌, E-mail: haobinzh@yahoo.com

PCR 引物序列:所有引物均由上海生工公司合成。*MSTN* 引物为兼并引物,根据已知其他种类MSTN,如小鼠MSTN (AAO46885)、银大麻哈鱼MSTN1(AAR08901)、银大麻哈鱼 MSTN2(AAO15420) 和斑马鱼 GDF8 (AAQ11222)、MSTN2(AAT95431) 的保守序列设计。上游引物MSTN5为5′-GCTCCHAAYATYAGCCGRGABRT-NGTSAAGCAGCTS-3′,其对应的氨基酸序列为 APNIS-RDV(T) VKQL;下游引物MSTN3为5′-TCANGAGCABG-CRCADYGGTCBACYACCATSGANGG-3′,其对应的氨基酸序列为PSMVVDRCGCS* (* 代表终止密码)。MSTN 的扩增片段长度约为1kb。β-肌动蛋白基因引物为特异性引物,上游为5′-TCCGGTATGTGCAAAGCCGG-3′,下游为5′-CCACATCTGCTGGAAGGTGG-3′,扩增片段长度为1029bp。

1.2 总RNA的提取 组织总RNA的提取采用Trizol(invitrogen 公司)试剂并依照试剂说明书进行。RNA 溶液-80℃保存。

1.3 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR) cDNA 的合成按照《分子克隆》所述方法进行[20]。以适量总RNA为模板,以Oligo(dT)为引物,在M-MLV (Promega 公司)逆转录酶的作用下,42℃温育1.5h,合成cDNA第一链。合成的cDNA于-20℃保存。PCR 反应体系中包括模板cDNA、1mmol/L dNTP (Rson 公司)、PCR 缓冲液、1U Taq 酶(TaKaRa 公司)、2 mmol/L 引物(*MSTN* 引物或β-肌动蛋白基因引物),总体积25μL。PCR 程序为94℃预变性5min;94℃ 20s,52℃ 20s (MSTN) 或55℃ 20s (β-肌动蛋白),72℃ 90s,35个循环;72℃延伸5min。扩增产物在1%琼脂糖凝胶上电泳检测,电泳结果采用紫外成像仪拍照。

1.4 PCR产物的回收、连接、转化和测序 MSTN的PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分离后,切取所需条带,采用凝胶回收试剂盒(玻璃奶方法,Fermentas 公司)回收DNA。回收的DNA在T4连接酶的作用下,16℃ 4h,连接到T-载体pMD18-T(TaKaRa 公司)上。连接产物转化后筛选阳性克隆,提取质粒并进行测序。DNA序列的测定由华大生物技术公司进行。

1.5 序列比较分析 所测序列在NCBI网上进行BLAST分析,采用Blastn方法以判定所测序列是否为*MSTN*。其后,采用分子生物学软件DNAMAN翻译所得序列为氨基酸序列,在NCBI网站用Rpsblast进行保守结构域的分析;并采用ClustalW方法,与其他鱼类相对应的MSTN氨基酸序列进行多重比较,计算遗传距离值。遗传距离的计算方法采用泊松校正方法,观察到的歧异值再进行氨基酸替代的泊松分布校正。分子系统树是以遗传距离值为基础,采用相邻-结合(Neighbor-Joining)方法建立的[21]。

2 结果和分析

2.1 鲤鱼*MSTN*序列及其分析

采用兼并引物和RT-PCR方法对鲤鱼肌肉组织中的*MSTN*进行扩增,得到了一条特异的扩增带,其大小约1kb(图1)。这条特异扩增产物经回收和双向序列测定,得到序列信息(图2)。

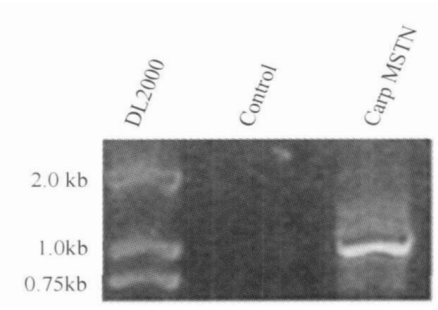

图1 鲤鱼肌肉组织*MSTN*的RT-PCR结果

Fig.1 RT-PCR results of *MSTN* from muscle of common carp with degenerate primers

鲤鱼*MSTN*的PCR产物为921bp,该片段编码306个氨基酸。用该序列作Blast分析,所得相似基因均为*MSTN*,同源性81%—94%。鲤鱼MSTN蛋白有两个典型的TGF-β蛋白结构域(图2)。一个是TGF-β前肽结构域,E值为$2e^{-6}$;从第30位到第186位,共157个氨基酸残基。前肽结构域具有抑制MSTN活性的作用。另一个是TGF-β或类TGF-β结构域,是TGF-β家族基因的活性结构域,E值为$3e^{-31}$或$5e^{-24}$;从第212位至第306位,共95个氨基酸残基。鲤鱼MSTN蛋白质也有典型的RXXR蛋白酶水解位点,为RIRR(第194—197位);并且有9个保守的半胱氨酸残基,分别为第203、212、213、240、244、270、271、303和305位氨基酸(图2)。

鲤鱼MSTN氨基酸序列和其他鱼类MSTN和斑马鱼生长分化因子11(Growth differentiation factor 11, GDF11)相对应的氨基酸序列的多重比较结果见图3。鲤鱼MSTN与其他鱼类相关蛋白质的同源性为71.6%—96.7%,与斑马鱼GDF-8即MSTN1同源性最高达96.7%;与其他各蛋白质的同源性依次为银大马哈鱼MSTN1、银大马哈鱼MSTN2、斑点叉尾MSTN、河豚MSTN2、斑马鱼MSTN2、河豚MSTN1和斑马鱼GDF11,分别为91.1%、90.2%、88.9%、84.6%、72.6%、72.5%和71.5%。鲤鱼MSTN与斑

```
  1   GCTCCTAATATTAGCCGGGACGTGGTCAAGCAGCTGTTACCCAAAGCACCGCCTTTGCAA
  1    A  P  N  I  S  R  D  V  V  K  Q  L  L  P  K  A  P  P  L  Q

 61   CAACTTCTGGATCAGTACGACGTTCTGGGGGATGACAGTAAAGATGGAGCTATGGAAGAG
 21    Q  L  L  D  Q  Y  D  V  L  G  D  D  S  K  D  G  A  M  E  E

121   GATGATGAACATGCCACCACAGAGAACATCATGACCATGGCCACAGAGCCTGACCCCATC
 41    D  D  E  H  A  T  T  E  N  I  M  T  M  A  T  E  P  D  P  I

181   GTTCAAGTAGATCGGAAACCGAAGTGTTGTTTCTTCTCCTTCAGTCCGAAGATCCAAGCG
 61    V  Q  V  D  R  K  P  K  C  C  F  F  S  F  S  P  K  I  Q  A

241   AACCGGATCGTAAGAGCGCAGCTCTGGGTTCATCTGAGACCGGCGGAAGAAGCGACCACC
 81    N  R  I  V  R  A  Q  L  W  V  H  L  R  P  A  E  E  A  T  T

301   GTTTTCTTACAGATATCACGGCTGATGCCTGTCGCGGACGGAGGAAGGCACATACGAATA
101    V  F  L  Q  I  S  R  L  M  P  V  A  D  G  G  R  H  I  R  I

361   CGATCCCTGAAGATCGATGTGAACGCAGGAGTGACGTCTTGGCAGAGTATAGACGTAAAA
121    R  S  L  K  I  D  V  N  A  G  V  T  S  W  Q  S  I  D  V  K

421   CAGGTGCTTACGGTGTGGTTAAGACAACCGGAGACCAACTGGGGCATTGAGATAAACGCG
141    Q  V  L  T  V  W  L  R  Q  P  E  T  N  W  G  I  E  I  N  A

481   TATGACGCGAAGGGAAACGACTTGGCCGTCACCTCAGCTGAGCCTGGAGAGGATGGACTG
161    Y  D  A  K  G  N  D  L  A  V  T  S  A  E  P  G  E  D  G  L

541   CTCCCCTTCATGGAGGTGAAAATCTCGGAGGGCCCAAAGCGAATCCGGAGGGACTCTGGG
181    L  P  F  M  E  V  K  I  S  E  G  P  K  R  I  R  R  D  S  G

601   CTGGACTGCGACGAGAATTCATCAGAGTCTCGATGCTGCAGGTACCCTCTCACTGTGGAC
201    L  D  C  D  E  N  S  S  E  S  R  C  C  R  Y  P  L  T  V  D

661   TTTGAGGCCTTCGGCTGGGACTGGATTATTGCTCCAAAACGCTATAAGGCGAATTACTGT
221    F  E  A  F  G  W  D  W  I  I  A  P  K  R  Y  K  A  N  Y  C

721   TCGGGAGAATGCGACTACATGCACCTGCAGAAATATCCCCACACCCATCTGGTGAACAAG
241    S  G  E  C  D  Y  M  H  L  Q  K  Y  P  H  T  H  L  V  N  K

781   GCCAATCCGCGAGGCACCGCCGGGCCCTGCTGCACCCCCACCAAGATGTCTCCCATCAAC
261    A  N  P  R  G  T  A  G  P  C  C  T  P  T  K  M  S  P  I  N

841   ATGCTTTACTTCAACGGCAAAGAGCAGATCATCTACGGCAAGATCCCATCCATGGTAGTG
281    M  L  Y  F  N  G  K  E  Q  I  I  Y  G  K  I  P  S  M  V  V

901   GACCGCTGCGGCTGCTCCTGA
301    D  R  C  G  C  S  *
```

图 2　鲤鱼 MSTN 的部分序列(cDNA 的碱基序列和蛋白质的氨基酸序列)

Fig 2　Partial sequences (cDNA and protein) of MSTN of common carp

下画线部分序列为引物序列; 具边框无阴影序列为前肽结构域; 黑体序列为成熟 MSTN 结构域; 具边框和阴影部分序列为保守的蛋白酶水解位点(RXXR) ; 具阴影的字母 C 代表保守的半胱氨酸残基

The letters with underline are the sequences of primers. The letters without shade in box are the sequences of predomain, and the bold letters are the sequences of mature MSTN domain. The letters in box with shade are the conservatively hydrolytic site (RXXR) , and the letters Cs with shade are the conservative cysteine residues

马鱼 GDF8 的遗传距离最小, 仅为 0. 033。与其他蛋白质的遗传距离依次为银大马哈鱼 MSTN1、银大马哈鱼 MSTN2、斑点叉尾　MSTN、河豚 MSTN2、斑马鱼 MSTN2、河豚 MSTN1 和斑马鱼 GDF11, 分别为 0. 089、0. 098、0. 111、0. 154、0. 274、0. 275、和 0. 284。分子进化树也表明鲤鱼 MSTN 与斑马鱼 GDF-8 关系最近, 鲤鱼 MSTN 与斑马鱼 GDF8、斑点叉尾　MSTN 聚为一枝。而与斑马鱼 MSTN2 的遗传距离较远, 说明其亲缘关系也较远。这些结果说明, 所得基因为鲤鱼的 *MSTN* 基因。

银大马哈鱼的 MSTN1 和 MSTN2 亲缘关系极近, 同源性达 94. 4%; 它们与斑马鱼 GDF8、鲤鱼 MSTN、斑点叉尾　MSTN 的同源性也很高, 说明它们由 MSTN1 发展进化而来; 而斑马鱼的两个 MSTN(GDF8 和 MSTN2) 以及河豚的两个 MSTN (MSTN1 和 MSTN2) 亲缘关系较远, 为分子进化上的不同分支,

起源于同一祖先。多重比较还说明MSTN 和 GDF11 是由共同祖先发展而来的两个不同基因。

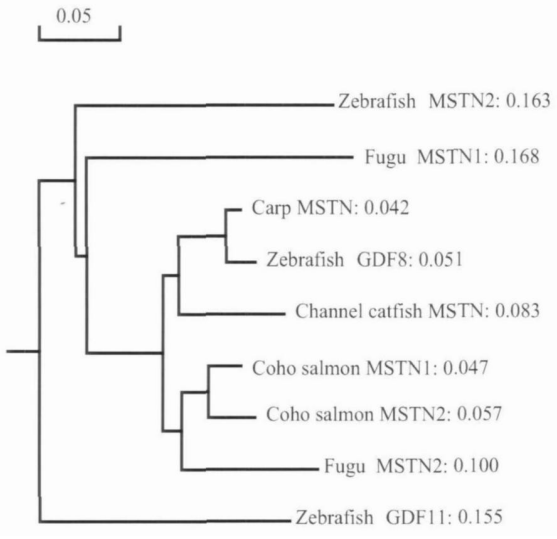

图3 鲤鱼MSTN 和其他鱼类MSTN 及 GDF11 的分子系统树

Fig 3 The phylogenetic tree of of MSTN proteins and GDF11 from carp and other fishes

鲤鱼MSTN 和其他鱼类MSTN 及斑马鱼 GDF11 蛋白质分子经过多重比较后,得到不同分子间的遗传距离。根据遗传距离,采用相邻结合方法建立分子进化树,遗传距离近的分子聚合在一起。线段长度代表遗传距离,遗传距离单位为 0 05;每个分子后的数值为序列权重。相似的序列遗传距离近,获得的序列权重也小;分子相似度越低,获得的分子权重值越高

The phyologenetic tree was established by neighbor-joining method based on the distances calculated with multialignment of different molecules, carp MSTN, zebrafish GDF11, and MSTNs of fugu, zebrafish, coho salmon, and channel catfish. The line length of the tree showes the distance, the distance unit (the scale bar) is 0 05. The values follow the proteins are the sequence weights. Similar sequences show less phylogenetic distance and obtain less weight, while more different sequences get more weight

2.2 鲤鱼 *MSTN* 的组织表达特征

采用 RT-PCR 方法,对成年鲤鱼各组织中的 *MSTN* 表达情况进行了分析,结果见图 4。鲤鱼 *MSTN* 仅在肌肉和脑组织中检测到,而其他所检测的组织如心脏、精巢、眼睛、肝脏、肠和鳃组织中未检测到。以β-肌动蛋白基因为对照,同时进行了不同组织的 RT-PCR 检测,在所检测的组织样品中均得到β-肌动蛋白基因的特异扩增带。这说明不同组织中RNA 的提取和反转录过程正常,模板 cDNA 完整;不同组织检测到的 *MSTN* 转录子存在的差异是各组织*MSTN* 表达情况的自然表现。

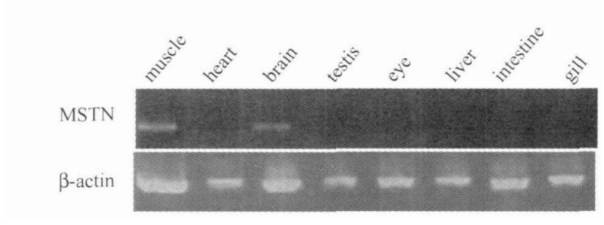

图 4 鲤鱼不同组织MSTN mRNA 的 RT-PCR 检测结果

Fig 4 The RT-PCR results of MSTN mRNA in different tissues of common carp

上图为鲤鱼 *MSTN*,下图为对照鲤鱼β-肌动蛋白

The upper panel is the RT-PCR results of *MSTN* in different tissues of common carp, and the lower panel is the RT-PCR results of β-actin in different tissues of common carp

3 讨 论

目前,*MSTN* 基因研究比较多[1],但国内外尚无鲤鱼 *MSTN* 基因的相关报道。我们得到的鲤鱼 *MSTN* 基因序列已包含 MSTN 的绝大多数功能区,包括前肽结构域和功能结构域,以及蛋白酶水解位点 RIRR 和 9 个保守的半胱氨酸残基。MSTN 的水解加工是由一种称为 Furin 的钙依赖性丝氨酸蛋白酶完成的,Furin 属于蛋白原转化酶。MSTN 的水解形成前肽(又称为潜在关联肽,Latent associated peptide, LAP)和成熟的MSTN 肽,成熟的 MSTN 分泌到细胞外,完成相关功能[22]。

多重序列比较表明鲤鱼MSTN 与斑马鱼 GDF8、斑点叉尾 MSTN 关系较近,这与物种的分类地位相似。鲤鱼和斑马鱼同为鲤形目(Cypriniformes)鲤科(Cyprinidae)鱼类,斑点叉尾 为鲇形目(Siluriformes)叉尾 科(Ictaluridae),但均属骨鳔总目(Ostariophysi)。鳟鲑鱼类具有两个 MSTN,而且这两个 MSTN 亲缘关系较近,是基因重复的结果[8—10]。斑马鱼和河豚 MSTN 也都有两个不同的 *MSTN* 基因,说明鱼类基因重复是一个较为普遍的现象。斑马鱼 MSTN1 和 MSTN2 的差异较大,可能在斑马鱼中 *MSTN* 基因重复的发生较早,造成两个基因在进化中产生较大差异[6]。鲤鱼也被认为是一个自然的四倍体种类,在进化过程中发生染色体加倍[23]。但是我们采用兼并引物,RT-PCR 仅得到一个特异的 *MSTN* 基因,在鲤鱼中是否存在第二个 *MSTN* 基因有待进一步探索。

MSTN 通过抑制 MyoD 家族成员转录活性负向控制肌细胞的生长发育, 它的表达量与肌肉重量的变化呈负相关[1—4]。*MSTN* 基因的表达在哺乳动物中仅局限于骨骼肌, 为肌肉特异基因。然而, 鱼类 *MSTN* 基因的表达特征与哺乳类不同[1]。斑马鱼 *MSTN* 的表达不仅局限于骨骼肌, 还可以在肝、心、胃、鳃、卵巢、精巢、肾、肌肉、眼和脑等所有检测的组织中表达[5,17]。在金头鲷稚鱼发育过程中, 可以在皮肤、脑、肌肉、咽、鳃、胰和肝中检测到 *MSTN*; 从变形开始, 还可以在金头鲷食管、胃、肠和肾中检测到[24]。但我们对鲤鱼 *MSTN* 的表达特征所作的分析表明, 鲤鱼 *MSTN* 仅在肌肉组织和脑组织中表达, 而在其他所检测的组织中未见表达, 其表达具有一定的组织特异性。鲤鱼 *MSTN* 的组织表达特征与溪红点鲑的脑-肌型 *MSTN* (b/m *MSTN*) 的表达分布类似[7,8], 说明鲤鱼 *MSTN* 不仅在肌肉发育和增长中有重要作用, 还可能在神经系统发育中有其作用。但目前还没有关于鱼类 *MSTN* 与神经发育有关的研究报道。

鱼类 *MSTN* 基因的表达分布虽然广泛, 但其基本功能依然与肌肉的发育有关。用肌肉特异启动子驱动 *MSTN* 前体肽在转基因斑马鱼中有过表达, 转基因鱼骨骼肌肌纤维数目增加[17]。斑马鱼 *MSTN* 的表达用反义的 Morpholinos 抑制后, 受精后 20h, 处理的胚胎生长快、个体大, 体节数目多、体节长度和宽度增加[5]。Acosta 等给斑马鱼受精卵注射与罗非鱼 MSTN C 末端结构域对应的 dsRNA, 也导致斑马鱼早期胚胎的增生或肥大[18]。

鲤鱼 *MSTN* 基因的克隆为今后进一步研究鲤鱼肌肉生长分化及其调节打下了基础, 并为进行转基因动物育种和其他应用研究创造了条件。通过 MSTN 作用机制的研究, 有可能发现一些促进动物肌肉生长的小分子调节物质; 这些小分子物质就可以作为促进动物肉类生产的促进剂。通过被动免疫的方式, 有可能使动物鱼产量提高。如注射 MSTN 疫苗, 使试验动物小鼠和鸡的肌肉和体重增加[25]; 用猪的MSTN 免疫注射小鼠, 也使受试小鼠的体重增加[26]。通过转基因技术, 在鱼肌肉中过量表达前肽[17], 或者特异的表达 *MSTN* 的反义基因[18], 均有望提高转基因鱼的肉产量, 有可能育成新的养殖品种。

参考文献:

[1] Zhao H B, Peng K, Wang Y F, Hu W. Progress of studies on myostatin of fish [J]. *Acta Hydrbiologica Sinica*, 2006, **30**(2): 227—231 [赵浩斌, 彭扣, 王玉凤, 胡炜. 鱼类肌肉生长抑制素(Myostatin) 研究进展. 水生生物学报, 2006, **30**(2): 227—231]

[2] McPherron A C, Lawler A M, Lee S. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-β superfamily member [J]. *Nature*, 1997, **387**: 83—90

[3] Grobet L, Martin L J R, Poncelet, *et al*. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle [J]. *Nature Genetics*, 1997, **17**: 71—74

[4] McPherron A C, Lee S. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**: 12457—12461

[5] Amali A A, Lin C J, Chen Y, *et al*. Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1 [J]. *Dev. Dyn.*, 2003, **229**: 847—856

[6] Biga P R, Roberts S B, Iliev D B, *et al*. The isolation, characterization, and expression of a novel GDF11 gene and a second myostatin form in zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.*, 2005, **141**: 218—230

[7] Roberts S B, Goetz F W. Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms [J]. *FEBS Lett.*, 2001, **491**(3): 212—216

[8] Roberts S B, Goetz F W. Myostatin protein and RNA transcript levels in adult and developing brook trout [J]. *Mol. Cell. Endocrin.*, 2003, **210**: 9—20

[9] Rescan P Y, Jutel I, Ralliere C. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *J. Exp. Biol.*, 2001, **204**(Pt 20): 3523—3529

[10] Østbye T, Galloway T F, Nielsen C, *et al*. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues [J]. *Eur. J. Biochem.*, 2001, **268**(20): 5249—5257

[11] Maccatrozzo L, Bargelloni L, Radaelli G, *et al*. Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure, and expression pattern [J]. *Mar. Biotechnol.*, 2001, **3**: 224—230

[12] Maccatrozzo L, Bargelloni L, Cardazzo B, *et al*. A novel second myostatin gene is present in teleost fish [J]. *FEBS Lett.*, 2001, **509**(1): 36—40

[13] Rodgers B D, Weber G M, Sullivan C V, *et al*. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops* [J]. *Endocrinology*, 2001, **142**: 1412—1418

[14] Kocabas A M, Kucuktas H, Dunham R A, *et al*. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, **1575**(1-3): 99—107

[15] Rodgers B D, Weber G M. Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone Americana* [J]. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 2001, **129**(2-3): 597—603

[16] Maccatrozzo L, Bargelloni L, Patarnello P, *et al*. Characterization of the myostatin gene and a linked microsatellite marker in shi drum

(*Umbrina cirrosa*, Sciaenidae) [J]. *Aquaculture*, 2002, **205**(1-2): 49—60

[17] Xu C, Wu G, Zohar Y, *et al*. Analysis of *myostatin* gene structure, expression and function in zebrafish [J]. *J. Exp. Biol.*, 2003, **206**: 4067—4079

[18] Acosta J, Carpio Y, Borroto I, *et al*. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype [J]. *J Biotechnol.*, 2005, **119**(4): 324—331

[19] Zhu Z, Li G, He L, *et al*. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1758) [J]. *Z. angew. Ichthyol.*, 1985, **1**: 31—34

[20] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989

[21] Saito N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol. Biol. Evol.*, 1987, **4**: 406—425

[22] Thomas M, Langley B, Berry C, *et al*. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation [J]. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**: 40235—40243

[23] Larhammar D and Risinger C. Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp, *Cyprinus carpio* [J]. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 1994, **3**: 59—68

[24] Radaelli G, Rowlerson A, Mascarello F, *et al*. Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study [J]. *Cell Tissue Res.*, 2003, **311**: 239—250

[25] Whittemore L, Song K, Li X, *et al*. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength [J]. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2003, **300**: 965—971

[26] Ma X, Cao Y, Shu D, *et al*. Cloning and expression of swine myostatin gene and its application in animal immunization trial [J]. *Sci. China Ser. C Life Sc.*, 2005, **48**: 368—374

CLONING OF *MYOSTATIN* OF COMMON CARP(*CYPRINUS CARPIO*) AND ITS EXPRESSION PATTERN IN DIFFERENT TISSUES

LI Xing-Mei[1], FAN Wei[1], ZHANG Bin[1], PENG Kou[1], WANG Yu-Feng[1], HU Wei[2] and ZHAO Hao-Bin[1]

(1. *School of Life Sciences, Huazhong Normal University, Wuhan* 430079; 2. *State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072)

Abstract: Myostatin (MSTN) is the negative regulator in the muscular development, and the studies of MSTN will benefit the animal production. We cloned the partial sequences of MSTN cDNA (Gene Bank # : EF551058) of common carp, a major aquaculture fish in China, by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with degenerate primers. The partial sequence of carp MSTN consists of 921 base pairs which encode 306 amino acids. The translation of the partial sequence of carp MSTN shows the common characterization of MSTNs, it has a predomain and a mature MSTN domain with conservative hydrolytic site, RIRR, and 9 cysteine residues. The carp MSTN has high homology of 96.7% with zebrafish (*Danio rerio*) GDF8. The expression pattern of carp *MSTN* was detected with RT-PCR in different tissues of adult fish, the results showed that the carp *MSTN* only could be detected in muscle and brain, we did not obtaine PCR results in other tissues detected. The expression pattern of *MSTN* indicated that carp MSTN could play important role in muscular development, and it could play some role in neural development.

Key words: Common carp (*Cyprinus carpio*); Myostatin; Cloning; Homology; Expression pattern