



# 西藏小型猪 MSTN 基因分子克隆及序列分析

吴清洪<sup>1</sup>, 岳敏<sup>1</sup>, 田雨光<sup>1,2</sup>, 王玉珏<sup>1</sup>, 徐名衬<sup>1</sup>, 顾为望<sup>1,2</sup>

(1. 南方医科大学实验动物中心比较医学研究所, 广州 510515; 2. 东莞松山湖明珠实验动物科技有限公司, 广东 东莞 523808)

**【摘要】** 目的 扩增西藏小型猪的肌肉生长抑制素(MSTN)基因编码区全长序列,并对序列进行生物信息学分析。方法 提取西藏小型猪肝脏组织的RNA,反转录成为cDNA,利用RT-PCR方法扩增MSTN基因编码区全长序列,将纯化的片段与pMD19-T载体连接,转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,筛选阳性克隆并测定其序列,利用生物信息学方法分析其序列特征,并与其他12种物种构建系统进化树。结果 西藏小型猪MSTN基因编码区全长1128 bp,编码375个氨基酸,氨基酸序列同源性分析表明,与版纳微型猪MSTN氨基酸序列相似性最高,为99%。结论 MSTN基因西藏小型猪除了与鸡和斑马鱼亲缘关系较远外,与人、犬、版纳微型猪、绵羊、山羊、牛、马、黑猩猩、大鼠、小鼠的关系都较为接近,其中与版纳微型猪的亲缘关系最为接近。

**【关键词】** 西藏小型猪;MSTN基因;克隆测序

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0018-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.003.04

## Cloning and sequence analysis of Tibet mini-pig's MSTN gene

WU Qing-hong<sup>1</sup>, YUE Min<sup>1</sup>, TIAN Yu-guang<sup>1,2</sup>, WANG Yu-jue<sup>1</sup>, XU Ming-chen<sup>1</sup>, GU Wei-wang<sup>1,2</sup>

(1. Laboratory Animal Center and Institute of Comparative Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Songshan Lake Pearl Laboratory Animal Sci. & Tech. Co., Ltd., Guangdong Dongguan 523808, China)

**【Abstract】 Objective** To amplify the encoding full-length sequence of Tibet mini-pigs myostatin (MSTN) gene and analysis the sequence by bioinformatics software. **Method** The RNA of liver tissues from Tibet mini-pig was extracted, and reversely transcribed into cDNA. The gene coding region sequence of myostatin gene was amplified through RT-PCR, and then the purified product of PCR was ligated with a pMD19-T and transferred into the bacterium DH5 $\alpha$  for replication. The positive clones were screened and sequenced. The sequence characters were analyzed by using bioinformatics method and phylogeny evolution tree was constructed with other twelve species. **Results** The coding region of MSTN gene was 1128bp, and coded 375 amino acids. The amino acid homology analysis showed that the homology rate of amino acid sequence was 99%. **Conclusions** Molecular phylogeny evolution indicated that it had a close relation with human, dog, banna minipig, sheep, goat, cattle, horse, chimpanzee, rat, mouse except chick and zebrafish, and the most closely related with banna minipig.

**【Key words】** Tibet mini-pig;MSTN gene;Cloning and sequence

肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)又称GDF- $\beta$ (growth differentiation factor  $\beta$ ),是生长转化因子

**【基金项目】** 广东省科技计划项目(2012B011000004、2012B010300001);广东省科技厅科技基础条件建设项目(2010B060500001);国家科技部国际合作项目(2011DFA33290)。

**【作者简介】** 吴清洪(1975-),男,本科,高级实验师,研究方向:实验动物学。Email:wuqhvip@126.com;

**【通讯作者】** 顾为望(1956-),男,教授,博士生导师,研究生方向:实验动物与比较医学。Email:guww100@163.com。

$\beta$  (transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ) 超家族的新成员<sup>[1-4]</sup>。MSTN 在骨骼肌中特异性表达,对肌肉生长有负调控作用,研究表明,该基因的突变在肉牛中会造成骨骼肌异常肥大<sup>[5]</sup>。通过抑制 MSTN 活性而增加肌肉量,在猪的分子育种具有潜在的应用价值。因此,该基因被发现后短短几年之内很多物种的 MSTN 基因得到克隆、测序和定位<sup>[6-8]</sup>。

乔宪凤等<sup>[9]</sup>在 2010 年就以湖北白猪背最长肌肌细胞总 RNA 为模版,利用 RT-PCR 技术,扩增出湖北白猪的 MSTN 基因的 cDNA 片段,其测序结果与报道的一致。西藏小型猪是 2004 年南方医科大学实验动物中心从西藏工布江达县引入纯种的 45 头西藏小型猪,作为实验动物进行封闭群管理<sup>[10]</sup>。目前已完成风土驯化及实验动物化研究,并开展了相关动物模型、药物实验及转基因克隆等研究。从免疫学、遗传学研究发现,该品系具有独特的免疫相关指标和遗传特征,加上其独特的外形,是一种优良的实验用小型猪品种<sup>[11-13]</sup>。研究西藏小型猪的 MSTN 基因,可为进一步开展西藏小型猪分子育种技术研究等提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物:西藏小型猪 6 月龄 1 头,来源于南方医科大学实验动物中心【SCXK(粤)2011-0074】,取其肝脏,液氮速冻, -80℃ 冰箱保存。

#### 1.1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒(No. DP419)、质粒小提试剂盒(No. DP103)、DH5 $\alpha$  感受态细胞(No. CB101)购自天根生化科技(北京)有限公司; PrimeScript RT reagent Kit(No. DRR037A)、EX Taq(No. DR001A)、pMD19-T Vector(No. D102A)、HindIII 内切酶、EcoRI 内切酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自广东省东盛生物科技有限公司; DM2000 购自北京康为世纪生物科技有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 RNA 的提取

使用天根公司的 RNA 提取试剂盒提取肝脏组织的总 RNA。组织从 -80℃ 冰箱中取出来,用液氮冷却研磨成粉末,倒入去 RNA 酶的 1.5 mL EP 管中,加入 1 mL Trizol,反复吹打室温静置 5 min,按照

试剂盒说明按步骤提取。利用核酸蛋白浓度测定仪 Nano Drop 2000 测 RNA 浓度及纯度(OD260/OD280),余下样品 -20℃ 保存。

#### 1.2.2 cDNA 合成

使用宝生物公司的 PrimeScript RT reagent Kit 进行逆转录反应。cDNA 合成按下列组份配制 RT 反应液(反应液配制在冰上进行)。5  $\times$  PrimeScript Buffer 4  $\mu$ L, PrimeScript RT Enzyme Mix 1 1  $\mu$ L, Oligo Dt Primer (50  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, Random 6 mers (100  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, Total RNA 1  $\mu$ g, RNase Free dH<sub>2</sub>O 加至 20  $\mu$ L。反转录反应条件为:37℃ 15 min (反转录反应), 85℃ 5 s (反转录酶的失活反应)。-20℃ 保存备用。

#### 1.2.3 PCR 引物的设计和合成

根据 GenBank 中猪 MSTN 基因的序列(Gene Accession No.: NM\_214435),运用引物设计软件 Primer5.0 设计特异性引物,由 Invitrogen 公司合成。引物为:Up (P1): 5'-ATGCAAAAAGCTGCAAATCTA TGTTTATATTTAC-3', Down (P2): 5'-TCATGAGCA CCCACAGCGATCTAC-3'

#### 1.2.4 PCR 扩增

在 PCR 反应管中配置 25  $\mu$ L 的反应体系,模板量为 0.5  $\mu$ L 猪 cDNA 扩增 MSTN。25  $\mu$ L 的反应体系为 2.5 mmol/L dNTP mixture 2  $\mu$ L, 10  $\times$  Ex Taq buffer 2.5  $\mu$ L, 模板 cDNA 0.5  $\mu$ L, 引物 P1 2.5  $\mu$ L, 引物 P2 2.5  $\mu$ L, ExTaq 0.3  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 14.6  $\mu$ L。扩增条件为:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min 20 s, 32 个循环; 72℃ 5 min; 16℃ 保存。

#### 1.2.5 PCR 产物的回收纯化

PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳后,在紫外条件下,手术刀切取含目的片段的凝胶条带至干净 1.5 mL EP 管中,利用广东省东盛生物科技有限公司的 DNA 凝胶回收试剂盒纯化目的片段,纯化产物中一部分直接测序,一部分进行克隆测序。

#### 1.2.6 目的片段与载体连接

将纯化的目的片段与 pMD19-T 载体进行连接,反应体系 10  $\mu$ L: 1  $\mu$ L pMD19-T Vector, 2  $\mu$ L 回收的 PCR 产物, 5  $\mu$ L Solution I, 2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。恒温循环水浴 16℃ 连接 2 h。

#### 1.2.7 连接产物的转化、复苏和培养

冰浴中将 6  $\mu$ L 连接产物加入至 30  $\mu$ L DH5 $\alpha$  感受态细胞中,混匀,冰浴 30 min, 42℃ 水浴热休克 90 s, 再冰浴 2 min。分别加入 200  $\mu$ L LB 培养基

(Amp<sup>-</sup>), 混匀, 37℃、200 r/min 振荡培养 1 h, 将菌液涂布与含氨苄青霉素 (Amp<sup>+</sup> 100 μg/mL) 的 LB 平板表面, 室温下放置, 至液体吸收。倒置平板, 转移至 37℃ 生化培养箱中, 正置培养 1 h 后, 倒置过夜培养。

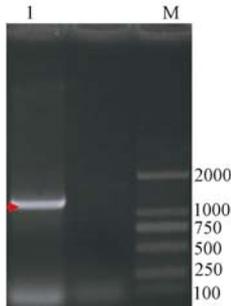
1.2.8 质粒的酶切鉴定阳性克隆

从平板上面各接种若干菌落于 3 mL LB 液体培养基 (Amp<sup>+</sup>) 的 15 mL 离心管中 200 r/min, 37℃ 摇床过夜培养。使用天根的质粒小提试剂盒提取质粒, 进行酶切鉴定, 反应体系为 10 μL:4 μL 的提取质粒, 10 × M Buffer 1 μL, HindIII 0.4 μL, EcoRI 0.4 μL。37℃ 酶切 2 h。酶切产物以含溴化乙锭 (EB) 的 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像系统成像。阳性菌液送金唯智基因公司测序。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果

从西藏小型猪肝脏组织中提取总 RNA, 逆转录后, 以 cDNA 为模板, 以特异性引物扩增到了 1152 bp 长的片段, 与预期相符 (图 1)。



注: M: DL2000, 1: RT-PCR 的结果。

图 1 RT-PCR 扩增结果

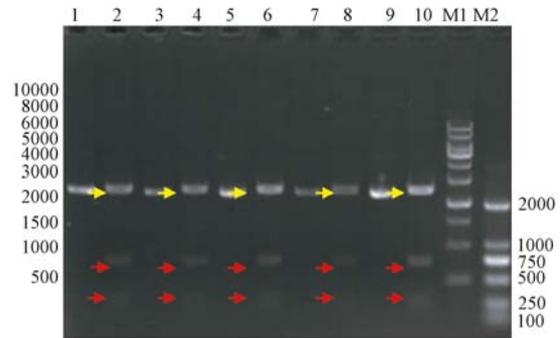
Note: M: DL2000, 1: the result of RT-PCR.

Fig. 1 The electrophoresis of RT-PCR amplification

2.2 重组质粒酶切电泳结果

将西藏小型猪的 RT-PCR 产物经纯化回收后,

插入到 pMD19-T 载体的外源基因插入位点, 构建重组质粒, 重组质粒经 HindIII 内切酶、EcoRI 内切酶双酶切 (图 2)。



注: 1, 3, 5, 7, 9: 重组质粒电泳图, 2, 4, 6, 8, 10: HindIII 和 EcoRI 双酶切电泳图。

图 2 重组质粒和酶切鉴定图

Note: 1, 3, 5, 7, 9: the electrophoresis of recombinant plasmid, 2, 4, 6, 8, 10: the electrophoresis of recombinant plasmid by restriction enzyme digestion (HindIII + EcoRI), M1: 1kb DNA Ladder, M2: 2 kb DNA Ladder.

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by digested (HindIII + EcoRI) and plasmid

2.3 西藏小型猪 MSTN 基因序列分析和比对

利用 DNAMAN、Lasergene 等多个生物信息学软件由西藏小型猪 MSTN cDNA 序列可以获得编码的 375 氨基酸 (图 3)。与 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLAST 后下载的人 (NM005259.2)、小鼠 (NM010834)、大鼠 (NM019151)、山羊 (HM462261)、黑猩猩 (NM001079919)、牛 (GQ184147)、绵羊 (NM001009428.1)、犬 (NM001002959)、版纳微型猪 (JN630464)、马 (NM001081817)、鸡 (NM001001461) 11 个物种的氨基酸序列进行比对, 相似性分别为 95%、92%、91%、95%、95%、94%、94%、93%、99%、97%、85%。

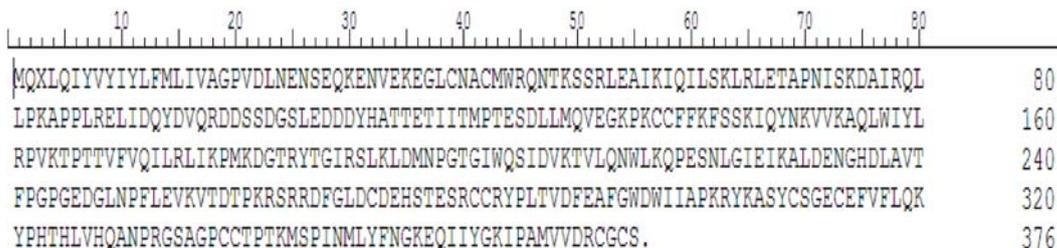


图 3 西藏小型猪 MSTN 基因推导蛋白氨基酸序列

Fig. 3 The putative amino acid sequence of MSTN gene of Tibet mini-pigs

## 2.4 西藏小型猪 MSTN 进化树

利用 Mega6.0 软件将西藏小型猪的 MSTN 氨基酸序列与人、小鼠、大鼠、山羊、黑猩猩、牛、绵羊、犬、版纳微型猪、马、鸡、斑马鱼 12 个物种的 MSTN 氨基酸序列构建进化树(图 4)。结果显示,西藏小型猪 MSTN 基因除了与鸡和斑马鱼亲缘关系较远外,与其他 10 个物种较为接近,其中与版纳微型猪的亲缘关系最为接近。

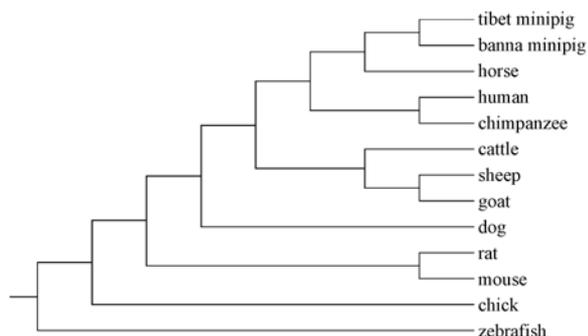


图 4 MSTN 分子系统进化树

Fig. 4 The phylogenetic tree of MSTN protein

## 3 讨论

1997 年, McPherron 等通过筛选小鼠的骨骼肌 cDNA 文库而得到全长的 cDNA 序列。分析表明, 小鼠 Myostatin cDNA 序列中只有一个开放阅读框架 (opening reading frame, ORF), 编码 376 个氨基酸, 具有 TGF- $\beta$  超家族的典型结构, 但与其它 TGF- $\beta$  家族成员的同源性很低, 因而被为新一类: GDF-8 (growth-differentiation factor 8)。研究表明, GDF-8 前肽 C-末端区域对其功能的稳定性具有重要的作用, 抑制性区域位于氨基酸 42 ~ 115 之间<sup>[14-16]</sup>。国外 Lee 及其同事 Daneau 等<sup>[17]</sup> 都报道了猪肌生成抑制素基因的 cDNA 序列, 综合两者的结果, 已得到 1756 bp 的猪肌生成抑制素 cDNA 序列, 其中 1 ~ 1125 bp 编码氨基酸序列, 表明猪肌生成抑制素前体由 375 个氨基酸组成。本研究通过对西藏小型猪的 MSTN 基因的 cDNA 序列进行了克隆测序, 发现 MSTN 基因编码区全长 1128 bp, 利用 DNAMAN、Lasergene 等多个生物信息学软件由西藏小型猪 MSTN cDNA 序列可以获得编码的 375 氨基酸。与版纳微型猪进行比对分析发现在 307 位的氨基酸由 N $\rightarrow$ S。

在与人、小鼠、大鼠、山羊、黑猩猩、牛、绵羊、犬、版纳微型猪、马、鸡 11 个物种的氨基酸序列进行比对, 相似性分别为 95%、92%、91%、95%、95%、

94%、94%、93%、99%、97%、85%, 发现西藏小型猪与版纳微型猪的相似性最高, 达 99%。与人、山羊、黑猩猩、马相应序列同源性都超过了 94%。表明西藏小型猪与 11 个物种间在该基因编码区核苷酸序列间具有较高的保守性。

分子系统进化树表明 MSTN 基因西藏小型猪除了与鸡和斑马鱼亲缘关系较远外, 与人、犬、版纳微型猪、绵羊、山羊、牛、马、黑猩猩、大鼠、小鼠的关系都较为接近, 其中与版纳微型猪的亲缘关系最为接近, 这也更进一步说明了西藏小型猪与版纳微型猪是亲缘关系较近的两个猪种, 只是在该基因核苷酸和氨基酸水平上有很小差异, 说明了西藏小型猪与版纳小型猪起源及进化程度有所不同, 它们在 DNA 水平上有极小的差异, 这也为进一步开展西藏小型猪分子育种技术研究等提供了理论依据。

## 参考文献:

- [1] McPherron A C, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the Myostatin gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(23): 12457 - 12461.
- [2] 岳敏, 顾冬生, 李洪涛, 等. 西藏小型猪 MSTN 基因 5' 调控区的酶切多态性分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(3): 155 - 159.
- [3] 王伟, 连林生, 李继中, 等. 猪 MSTN 基因生物信息学分析 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(10): 5943 - 5945.
- [4] 刘晓琴, 马喜山, 唐中林, 等. 猪 MSTN 基因的多态性和生长性状关联分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(7): 1063 - 1069.
- [5] Holmes J H G, Ashmore C P. A histochemical study of mutable site fiber type and size in normal and double muscled cattle [J]. Growth, 1972, 36: 351 - 352.
- [6] Kollias H D, McDermott C. Transforming growth factor- $\beta$  and myostatin signaling in skeletal muscle [J]. J Appl Physiol, 2008, 104: 579 - 587.
- [7] Hill J J, Davies M V, Pearson A A, et al. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum [J]. J Biol Chem, 2002, 277(43): 40735 - 40741.
- [8] Ji S, Losinski R L, Cornelius S G, et al. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation [J]. American Journal of Physiology, 1998, 275: 1265 - 1273.
- [9] 乔宪凤, 刘西梅, 华文君, 等. 猪肌肉生成抑制素 (MSTN) 基因 cDNA 克隆及序列分析 [J]. 江西农业学报, 2010, 22(10): 130 - 132.
- [10] 李洪涛, 顾为望, 袁进, 等. 实验用西藏小型猪原代和第一代间部分血液指标比较 [J]. 郑州大学学报 (医学版), 2008, 43(1): 63 - 65.
- [11] 王玉珏, 郭凯, 陈驰, 等. 不同辐射剂量对西藏小型猪小肠线

- 粒体的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2012, 32 ( 10 ): 1445 - 1450.
- [12] 黄威, 毛莹莹, 刘薇, 等. 3 种腺相关病毒介导的绿色荧光蛋白对西藏小型猪胚胎成纤维细胞的转染效率 [J]. 南方医科大学学报, 2012, 32 ( 6 ): 857 - 861.
- [13] 李洪涛, 吴清洪, 袁进, 等. 实验用西藏小型猪线粒体 DNA 控制区变异类型及其血液指标比较研究 [J]. 南方医科大学学报, 2009, 29 ( 8 ): 1626 - 1628.
- [14] McPherron A C. *et al.* Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member [J]. *Nature*, 1997, ( 387 ): 83 - 90.
- [15] McPherron A C, Lee S J. The transforming growth factor  $\beta$ -superfamily [A]. In: B. D. Lefterich and C. Bondy, editors. *Growth factors and cytokines in health and disease. ( Volume 1 )* [M]. *JAIPress Inc.* Greenwich, Connecticut, USA, 1996. 357 - 393.
- [16] Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, *et al.* Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade [J]. *Nature*, 2002 Nov 28; 420 ( 6914 ): 418 - 421.
- [17] 张利媛, 岳文斌. MSTN 基因的研究进展 [J]. *草食家畜*, 2006 ( 132 ): 1 - 4.

[修回日期] 2015-02-27