

文章编号:1000-0615(2007)02-0145-07

泥鳅肌肉生长抑制素基因片断的克隆及其表达

彭扣¹, 陈伟伟¹, 胡炜², 王玉凤¹, 赵浩斌¹

(1. 华中师范大学生命科学学院, 湖北 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, 湖北 武汉 430074)

摘要:肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)是动物肌肉生长发育的负调控因子。以泥鳅肌肉cDNA为模板,采用RT-PCR方法克隆了泥鳅MSTN基因的主要片段,其长度为815 bp,编码271个氨基酸残基。泥鳅MSTN具有MSTN的共同特征,有蛋白酶水解位点RIRR和保守的半胱氨酸残基。RT-PCR分析表明该基因在肌肉中显著表达,在眼中也有微弱表达,而在其他所检测组织(脑、鳃、心脏、肝脏、肠、精巢、卵巢)未见表达。此结果表明泥鳅MSTN基因除对肌肉生长发育有调控作用以外,还可能在眼的发育中有一定作用。

关键词:泥鳅;肌肉生长抑制素;克隆;组织表达

中图分类号:Q 785; S 917.4

文献标识码:A

Cloning of partial sequence of myostatin of *Misgurnus anguillicaudatus* and its tissue expression analysis

PENG Kou¹, CHEN Wei-wei¹, HU Wei², WANG Yu-feng¹, ZHAO Hao-bin¹

(1. School of Life Sciences, Huazhong Normal University, Wuhan 430079, China;

2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: Myostatin (MSTN), a member of transforming growth factor (TGF)- β superfamily is a negative regulator of muscle development. The partial sequence of MSTN of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) was cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from muscle of loach. The segment of MSTN cDNA is 815 base pairs which encode 271 amino acid residues. The loach MSTN has the typical structure of MSTN, including a pre-domain, mature MSTN domain, conservative hydrolytic site (RIRR), and 7 conservative cysteine residues. The expression pattern of MSTN of loach was checked by RT-PCR, the results showed that the MSTN was expressed strongly in muscle and weakly in eyes; however there were not any detectable expression in other tissues such as brain, gill, heart, liver, intestine, testis, and ovary. The results showed that MSTN plays an important role in muscular development, and perhaps it has some functions in eye development.

Key words: *Misgurnus anguillicaudatus*; myostatin; cloning; tissue expression

收稿日期:2006-09-06

资助项目:淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金(2005FB18);教育部留学回国人员科研启动基金

作者简介:彭扣(1980-),男,江西九江人,硕士,主要从事水生动物发育生物学研究。E-mail: pengkouyang@yahoo.com.cn

通讯作者:赵浩斌, Tel: 027-67867704; E-mail: haobinzh@yahoo.com

肌肉的生长和发育受多种因素的影响,如环境(气候、营养等因素)、激素和分子调控等。在分子水平上,肌肉的生长除受正调控因子 MyoD 家族成员(MyoD, myogenin, myf5 和 MRF4 等)影响以外,还受一些负调控因子如肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)的影响^[1-2]。

肌肉生长抑制素又称生长分化因子 8 (growth differentiation factor 8, GDF8), 属转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 超家族成员, 较为保守, 主要存在于肌肉中^[2]。1997 年 McPherron 等^[2] 首次在小鼠 (*Mus musculus*) 胚胎和成年肌细胞中发现了 MSTN 基因的表达; MSTN 基因敲除后小鼠肌肉生长旺盛, MSTN 基因敲除鼠的体重是正常鼠的 2~3 倍。McPherron 和 Lee^[3] 又以小鼠 MSTN C-端保守序列为探针筛选不同物种的骨骼肌 cDNA 文库, 克隆了大鼠 (*Rattus norvegicus*)、人 (*Homo sapiens*)、猪 (*Sus scrofa domestica*)、牛 (*Bos taurus*)、绵羊 (*Ovis aries*)、鸡 (*Gallus gallus*)、火鸡 (*Meleagris gallopavo*)、狒狒 (*Papio hamadryas*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 的 MSTN 基因。MSTN 非常保守, 都有一个信号肽和一个 RXXR 蛋白水解加工位点。就 C-端而言, 小鼠、大鼠、人、猪、鸡、火鸡同源率为 100%, 狒狒、牛、绵羊仅有 1~3 个氨基酸不同, 斑马鱼与上述其他动物的同源率为 88%。随后, 比利时蓝牛 (Belgian blue) 和皮尔蒙特牛 (Piedmontese) MSTN 的自然缺失与变异被发现, 确证 MSTN 的突变是造成这两种牛的双肌臀性状的主要原因^[4]。肌肉生长抑制素基因作为肌肉发育的负调控基因, 其研究在理论上和生产上都有重要意义。

用转基因或基因表达抑制技术, 已经证实 MSTN 的负调节极大地促进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^[5-6]。目前, 已经在多种鱼类克隆得到 MSTN 基因^[1], 包括斑马鱼 (*Danio rerio*)^[6]、溪红点鲢 (*Salvelinus fontinalis*)^[7]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[8]、银大马哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*)^[7]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[9]、金头鲷 (*Sparus aurata*)^[10]、莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)^[11]、白鲈 (*Morone chrysops*)^[11]、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus*

punctatus)^[12]、条纹石鲈 (*Morone saxatilis*)^[13]、白石鲈 (*Morone americana*)^[13]、石首鱼 (*Umbrina cirrosa*)^[14] 和大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*)^[15] 等。

实验克隆了泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) MSTN 基因 cDNA 主要片段, 并作了组织表达分析, 作为进一步研究泥鳅 MSTN 基因的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

泥鳅(性成熟成体)购自武汉大东门水产品市场。所用试剂有 Trizol RNA 提取试剂盒 (Invitrogen 公司)、RNA 酶抑制剂 (ToYoBo 公司)、M-MLV 逆转录酶 (Promega 公司)、ExTaq 酶 (TaKaRa 公司)、dNTP (Rson 公司)、核酸分子量标准 DL2000 (TaKaRa 公司)、凝胶回收试剂盒 (TaKaRa 公司)、载体 pMD18-T (TaKaRa 公司)、T4 DNA 连接酶 (TaKaRa 公司)。

PCR 引物均由上海生工公司合成。MSTN 引物是根据鲤^①、稀有鮎鲫 (*Gobiocypris rarus*, 未发表资料) 和斑马鱼 GDF8 (AAQ11222) 的保守序列设计。上游引物 MSTN5 为: 5'-AAAGCACCGCCTTIGCAACAACCTT-3', 下游引物 MSTN3 为: 5'-CCGTTGAAGTAAAGCATGTTGATGG-3'。 β -肌动蛋白基因上游引物为: 5'-TCCGGTATGTGCAAAGCCGG-3', 下游引物为 5'-CCACATCTGCTGGAAGGTGG-3'。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

组织总 RNA 的提取采用 Trizol 试剂盒, 按说明书进行, 提取泥鳅肌肉、眼、脑、鳃、心脏、肝脏、肠、精巢和卵巢等组织 RNA。-80 °C 保存。

cDNA 合成按照 M-MLV 逆转录酶说明书进行。以适量总 RNA 为模板, 以 Oligo (dT) 为引物, 在 M-MLV 逆转录酶的作用下, 42 °C 温育 1.5 h, 合成 cDNA 第一链。-20 °C 保存。

1.3 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)

以组织 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系包括 1 μ L 适量浓度模板 cDNA、2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液、2 μ L dNTP (各 2.5 mmol \cdot L⁻¹) 1U Taq 酶、2 μ L 10 mmol \cdot L⁻¹ 的 MSTN 引物, 加水补充至总体积 25 μ L。PCR 程序为: 样品

① 李兴美, 范巍, 张彬, 等. 鲤鱼肌肉生长抑制素基因 (MSTN) 的克隆及组织表达特征.

94 °C 预变性 3 min; 94 °C 20 s, 60 °C 15 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

1.4 PCR 产物的克隆和序列分析

MSTN 的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离后, 切取目的条带, 回收纯化 PCR 产物。回收的 DNA 在 T4 连接酶的作用下, 与 pMD18-T 载体连接。重组子转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 涂在含氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜。随机挑取白色菌落, 用 PCR 法筛选阳性克隆, 并将 3 个阳性克隆送交上海联合基因公司测序。

所测序列在 NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) 上进行 BLAST 分析, 采用 Blastn 方法以判定是否为 MSTN 基因。然后, 采用分子生物学软件 DNAMAN 将所得 DNA 序列翻译成蛋白质序列, 再进行 Blastp 分析。从 NCBI 网站核酸数据库中得到其他相关鱼类 MSTN 基因和蛋白质序列, 采用 ClustalW 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 进行 MSTN 序列的多重比较, 并采用 Mega 2.1 软件进行泥鳅 MSTN 与其他相关鱼类 MSTN 的聚类分析。

2 结果与分析

2.1 泥鳅 MSTN 基因片段的扩增和克隆

采用 RT-PCR 方法进行泥鳅肌肉组织的 MSTN 扩增, 得到了 1 条特异的扩增带, 其大小约 0.8 kb (图 1)。经双向序列测定, 该 PCR 产物为 815 bp (图 2)。用该序列在 NCBI 上作 Blastn 分

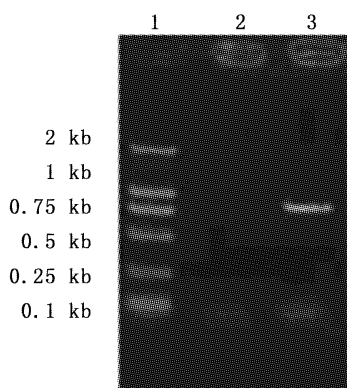


图 1 泥鳅肌肉组织 MSTN 的 RT-PCR 结果

Fig. 1 RT-PCR result of MSTN from muscle of loach

1. DNA 分子量标准 2000U; 2. 阴性对照
(用水作为模板); 3. 肌肉

1. DNA molecular weight marker d2000U;

2. negative control (using water as templet); 3. muscle

析, 所得相似基因均为 MSTN, 同源性为 78% ~ 88%。利用 DNAMAN 将所得序列翻译成氨基酸序列, 该片段编码 271 个氨基酸残基。Blastp 分析发现, 所得该氨基酸序列有两个典型的 TGF- β 蛋白结构域 (图 2)。一个是 TGF- β 前肽结构域, 前肽结构域具有抑制 MSTN 活性的作用^[16], 从第 16 位到第 172 位, 共 157 个氨基酸残基; 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, 从第 198 位至 271 位。泥鳅 MSTN 蛋白质也有典型的 RXXR 蛋白酶水解位点, 为 RIRR (第 180 - 183 位); 并且有 7 个保守的半胱氨酸残基, 分别为第 189、198、199、226、230、256、和 257 位氨基酸 (图 2)。

2.2 同源性分析

运用 ClustalW 软件对泥鳅的 MSTN 基因与鲤 (*Cyprinus carpio*) MSTN^①、斑马鱼 MSTN^[6]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) MSTN 1 和 MSTN 2^[8]、斑马鱼 MSTN 2^[17] 基因的核苷酸序列进行比较, 其同源性为 65% ~ 90%。氨基酸序列比较结果表明, 泥鳅 MSTN 氨基酸序列与斑马鱼 MSTN、鲤 MSTN、虹鳟 MSTN 1 和 MSTN 2、斑马鱼 MSTN2 的氨基酸序列具有很高的同源性 (图 3), 分别为 92%、94%、87%、87%、67%。

利用 Mega 2.1 软件 (相邻结合法) 对上述序列进行了聚类分析 (图 4), 结果泥鳅 MSTN 与鲤及斑马鱼 MSTN 聚为一枝, 斑马鱼 MSTN 与鲤 MSTN 亲缘关系最大, 其次为与泥鳅 MSTN 的关系; 而虹鳟 MSTN 聚为另一支。斑马鱼 MSTN2 与上述基因亲缘关系相距较远。

2.3 泥鳅 MSTN 基因的组织表达

采用 RT-PCR 方法, 检测了 MSTN 基因在泥鳅不同组织如肌肉、眼、脑、卵巢、鳃、肠、精巢、肝脏和心脏等中的表达情况, 同时以 β -肌动蛋白基因 (β -actin) 的表达作为内参照 (图 5)。结果仅在肌肉和眼组织里面检测到 MSTN 基因的表达, 肌肉的表达强烈, 眼组织表达较弱, 而在其他组织中不能检测到。

3 讨论

目前, 已经在多种鱼类克隆得到 MSTN 基因^[1], 我国也有人克隆到大黄鱼 MSTN 基因^[15]。我国的淡水养殖鱼类主要为鲤科鱼类, 因此, 我们致力于鲤科鱼类 MSTN 的克隆与功能研究, 已经

获得鲤 MSTN 基因^①和稀有鲟鲫 MSTN 基因^①。泥鳅目前已经成为重要的养殖对象之一,泥鳅 MSTN 基因的克隆及其调控研究将对泥鳅的生产产生积极的影响。所克隆的泥鳅 MSTN 基因序

列已近完整的阅读框架(ORF),包含主要功能片段,包括 MSTN 前肽结构域、MSTN 功能结构域、保守的蛋白酶水解位点 RXXR(RIRR)和 7 个保守的半胱氨酸残基(图 2)。

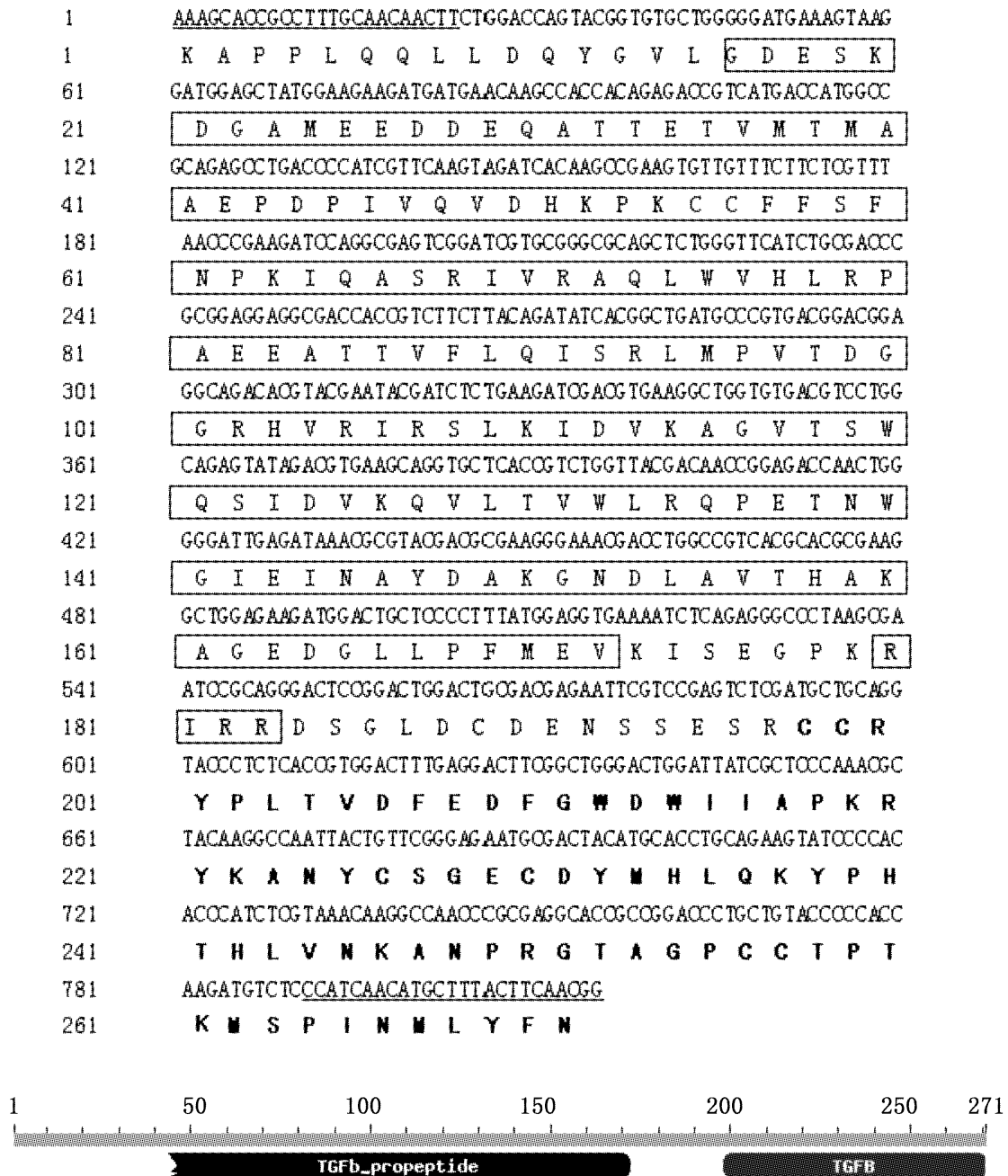


图 2 泥鳅 MSTN 的部分序列及结构分析

Fig. 2 Partial sequences and structure of MSTN of loach

下划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。下图为 Blastp 分析结果,该序列含 TGF-β 前肽结构域和 TGF-β 结构域。The letters with underline are the sequences of primers. The letters in box without shade are the sequences of prodomain, 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. The lower image is the Blastp result of MSTN of loach

<i>M. anguillicaudatus</i> MSTN	KAPPLQQLLDQYGVLDGDESKDGAMEEDDEQATTETVMTMAAEPDPIVQVDHKFKCCFFSF
<i>C. carpio</i> MSTN	-----D---D-----H---NI---T-----R-----
<i>D. rerio</i> MSTN	-----D---D---V---H---I---T-----R-----
<i>O. mykiss</i> MSTN1	-----D---DN---L---H-I---I---T-ES-----R---L---
<i>O. mykiss</i> MSTN2	-----K---D---DN---L---H-I---I---T-ES-----G-----
<i>D. rerio</i> MSTN2	-----RE-----DQN-GIS--E--SS--II--T--QA-T-LVGM---M-AL
<i>M. anguillicaudatus</i> MSTN	NPKIQASRIVRAQLWVHLRPAEEATTVFLQISRLMPVTDGGRHVRIRSLKIDVKAGVTSW
<i>C. carpio</i> MSTN	S---N-----A---I-----N-----
<i>D. rerio</i> MSTN	S---N-----K-----N-----
<i>O. mykiss</i> MSTN1	SS--VN--H-----L-D-V-----IG-----N--S--
<i>O. mykiss</i> MSTN2	-S---N-----Q-PD-V-----I-----NIQ-----N--S--
<i>D. rerio</i> MSTN2	S---LPDS-LK-L-IY-----P--YI--H-ESSSE-NN-S--AQ---N-RTD--
<i>M. anguillicaudatus</i> MSTN	QSIDVKQVLTVWLRQPETNHWGIEINAYDAKGNLAVTHAKAGEDGLLPFMEVKISEGPKR
<i>C. carpio</i> MSTN	-----S-EP-----
<i>D. rerio</i> MSTN	-----K---R-----STET-----
<i>O. mykiss</i> MSTN1	-----S-----F-S-----S-E-- --Q---T-----
<i>O. mykiss</i> MSTN2	-----S---D-----L-S-----S-E-- --Q-----
<i>D. rerio</i> MSTN2	-H-M--L-KL--K--QS-F--K-S--N-----S-ES-E-Q-L---DTG--
<i>M. anguillicaudatus</i> MSTN	IRRDGLDCDENSSERCCRYPLTVDFEDFGWDWIIAPKRYKANYCSGECDYMHLQKYPH
<i>C. carpio</i> MSTN	-----A-----
<i>D. rerio</i> MSTN	-----Y-----
<i>O. mykiss</i> MSTN1	F-----P-----E-----
<i>O. mykiss</i> MSTN2	S-----P-----E-----
<i>D. rerio</i> MSTN2	S---T-----H-T-----V----
<i>M. anguillicaudatus</i> MSTN	THLVNKANPRGTAGPCCTPTKMSPINMLYFN
<i>C. carpio</i> MSTN	-----
<i>D. rerio</i> MSTN	-----S-----
<i>O. mykiss</i> MSTN1	-----
<i>O. mykiss</i> MSTN2	-----
<i>D. rerio</i> MSTN2	S-I-----IFF-----IL-----

图3 泥鳅与其他鱼类 MSTN 氨基酸序列的比较

Fig.3 Alignment of the amino acid sequences of MSTN of loach and other fishes

泥鳅:*M. anguillicaudatus*, 鲤:*C. carpio*, 斑马鱼:*D. rerio* MSTN(AAQ11222.1)、MSTN2(NP_001019991.1), 虹鳟:*O. mykiss* MSTN1(AAK71707.1)、MSTN2(AAK71708.1)。

--- 表示相同的氨基酸,空位格表示该位氨基酸缺失。--- indicates the same amino acid

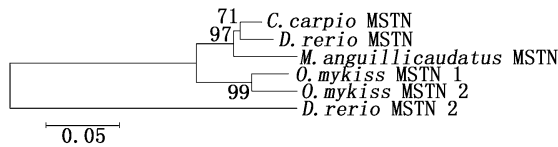


图4 应用 Mega2.1 软件根据泥鳅与其他鱼类 MSTN 氨基酸序列进行的聚类分析

Fig. 4 The phylogenetic tree computed by Mega 2.1 based on the amino acid sequences of MSTN of loach and other fishes
分支上的数字代表 bootstrap 值
The number in the branch is the bootstrap value

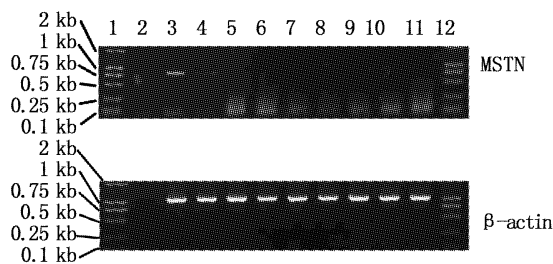


图5 泥鳅 MSTN 基因在组织中的表达
Fig. 5 The tissue distribution of MSTN of loach by RT-PCR

1. DNA 分子量标准 2000U; 2. 阴性对照; 3. 肌肉; 4. 眼; 5. 脑; 6. 卵巢; 7. 鳃; 8. 肠; 9. 精巢; 10. 肝; 11. 心脏; 12. DNA 分子量标准 2000U
1. DNA molecular weight marker 2000U; 2. control; 3. muscle; 4. eye; 5. brain; 6. ovary; 7. gill; 8. intestine; 9. testis; 10. liver; 11. heart; 12. DNA molecular weight marker 2000U

MSTN 基因在鱼类进化过程中较为保守。同源性分析表明,泥鳅 MSTN 与斑马鱼 MSTN^[6]、鲤 MSTN^①、虹鳟 MSTN 1 和 MSTN 2^[8]、斑马鱼 MSTN2^[17] 的氨基酸序列具有较高的同源性,为 67%~94%。泥鳅 MSTN 与鲤 MSTN 同源性最高,为 94%;其次是斑马鱼 MSTN^[6],达 92%。聚类分析发现泥鳅 MSTN 与鲤^①及斑马鱼 MSTN^[6] 聚为一枝,虹鳟 MSTN 1 和 MSTN 2^[8] 聚为一枝,而泥鳅 MSTN 与斑马鱼 MSTN2 相距较远。泥鳅、斑马鱼和鲤同为鲤形目(Cypriniformes),其中斑马鱼与鲤属鲤科(Cyprinidae),泥鳅属鳅科(Cobitidae);序列同源性与物种的分类地位相似。由于鲑鳟鱼类在系统发生中发生了基因重复,因此往往会有同一基因的两个不同的同源子;因此银大麻哈鱼^[7]、虹鳟^[8]等,存在 MSTN 基因的两个异构体。在斑马鱼中克隆得到第 2 个 MSTN,即 MSTN2^[17],说明 MSTN 基因在鱼类系统发生过程中有基因重复现象。然而本研究采用特异引

物对泥鳅 MSTN 进行 PCR 扩增,只得到 1 个特异基因。其原因有二,一是所得克隆子较少,可能遗漏了另一个基因;一是采用的是特异引物,该引物无法使我们得到另外一个基因。是否泥鳅也存在两个 MSTN 基因,还有待进一步探索。

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,它的表达量与肌肉生长呈负相关^[1-4]。MSTN 基因的表达在小鼠和牛等哺乳动物仅局限于骨骼肌,为肌肉特异基因^[2-3]。然而,鱼类 MSTN 基因的表达特征与哺乳类不同,大多数已研究的鱼类 MSTN 除了在肌肉中表达外,还可在多种组织中广泛表达^[1]。如斑马鱼 MSTN 可以在骨骼肌、肝、心、胃、鳃、卵巢、精巢、肾、眼和脑等所有检测的组织中表达^[6]。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;变形后,还可以在金头鲷食管、胃、肠和肾中检测到^[5]。然而,泥鳅 MSTN 的组织 RT-PCR 检测结果表明,该基因在肌肉组织中强烈表达,在眼组织中有微弱表达,其他所检测组织中未见表达;说明泥鳅 MSTN 基因的表达具有一定的组织特异性。这一点和鲤 MSTN 的表达模式相似,鲤 MSTN 也主要在肌肉中表达^①,而与斑马鱼 MSTN 的表达模式不同。实验检测的 MSTN 表达有较强的特异性,可能设计的引物的扩增产物较长,非正常表达或者异构体无法检测出。MSTN 在鱼类和在哺乳类中组织表达的差异表明,其在鱼类可能有不同于哺乳动物 MSTN 基因的功能。

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。在转基因斑马鱼肌肉中过量表达 MSTN 前体肽,转基因鱼胚胎骨骼肌肌纤维数目增加^[18]。斑马鱼胚胎 MSTN 的表达被 Morpholinos 抑制后,胚胎生长加快,个体增大,体节增加^[6]。注射 MSTN 的 dsRNA 后,也使斑马鱼早期胚胎增生、肥大^[5]。

泥鳅 MSTN 基因的克隆为进一步研究 MSTN 在泥鳅肌肉生长分化中的作用打下了基础,为在泥鳅的生产和育种中的应用研究创造了条件。如采用 MSTN 的被动免疫等方法,有可能提高鱼产量。如小鼠经猪的 MSTN 免疫注射后,体重增加^[19]。给鸡胚胎注射 MSTN 抗体,孵出的小鸡肌肉增生^[20]。通过转基因技术,在泥鳅肌肉中过量表达前肽或者 MSTN 的反义基因,可望

培育生长迅速、肌肉丰富的养殖新品种。

参考文献:

- [1] 赵浩斌,彭 扣,王玉凤,等. 鱼类肌肉生长抑制素(Myostatin)研究进展[J]. 水生生物学报, 2006, 30(2): 227-231.
- [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, 387:83-90.
- [3] McPherron A C, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94:12457-12461.
- [4] Kambadur R, Sharma M, Smith T P, et al. Mutations in myostatin (GDF 8) in double-muscle Belgian Blue and Piedmontese cattle[J]. Genome Res, 1997, 7:910-916.
- [5] Acosta J, Carpio Y, Borroto I, et al. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype [J]. J Biotechnol, 2005, 119:324-331.
- [6] Amali A A, Lin C J, Chen Y H, 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, 2004, 229:847-856.
- [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, 491:212-216.
- [8] Rescan P Y, Jutel I, Rallièr 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.
- [9] Østbye T K, 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.
- [10] 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(NY), 2001, 3(3):224-230.
- [11] 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(4):1412-1418.
- [12] 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]. Biochem Biophys Acta, 2002, 1575(1-3):99-107.
- [13] 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 B (Biochem Mol Biol), 2001, 129(2-3):597-603.
- [14] 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.
- [15] Xue L, Qian K, Qian H, et al. Molecular cloning and characterization of the myostatin gene in croceine croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. Mol Biol Rep, 2006, 33(2):129-135.
- [16] 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(51):40235-40243.
- [17] 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(2):218-230.
- [18] Xu C, Wu G, Zohar Y, et al. Analysis of Myostatin gene structure, expression and function in zebrafish [J]. J Exp Biol, 2003, 206(Pt 22):4067-4079.
- [19] 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 Sci), 2005, 48(4):368-374.
- [20] Kim Y S, Bobbili N K, Paek K S, et al. Production of a monoclonal antimyostatin antibody and the effects of in ovo administration of the antibody on posthatch broiler growth and muscle mass [J]. Poult Sci, 2006, 85(6):1062-1071.