

文章编号: 1000-0615(2017)05-0658-11

DOI: 10.11964/jfc.20160810503

## 瘤背石磺肌肉生长抑制素基因的克隆及组织表达分析

刘欣, 史艳梅, 王冬凤, 沈和定\*, 杨铁柱, 李杰, 李柏航

(上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 为探究石磺由海洋向陆地进化过程中肌肉生长和发育的分子机制, 实验以石磺科贝类转录组数据为基础, 采用RACE方法从瘤背石磺肌肉中首次克隆到MSTN cDNA的全长并做了相应的组织表达分析。结果显示, 瘤背石磺MSTN基因cDNA全长2667 bp, 包括1650 bp的开放阅读框, 374 bp的5'端非翻译区, 643 bp的3'端非翻译区, 共编码549个氨基酸。预测该基因编码的蛋白质原子总量为8776, 分子式为 $C_{2774}H_{4331}N_{783}O_{862}S_{26}$ , 分子质量约为63.27 ku, 理论等电点为6.02, 信号肽预测结果显示, N端具有21个氨基酸长度的信号肽。瘤背石磺MSTN具有MSTN的共同特征, 包括蛋白酶水解位点RSRR和C端多肽生物活性区以及9个保守的半胱氨酸残基。通过进化树分析, 瘤背石磺MSTN与加州海兔MSTN的亲缘关系最近。RT-PCR结果显示, MSTN基因在各个组织中均有表达; 含肌纤维组织中的表达量低于内脏器官的表达量, 在胰腺中的表达量最高, 腹足表达量最低。MSTN基因一级结构具有很高的保守性, 说明该基因在进化上的限制性和功能的重要性; 同时该基因在石磺非肌肉组织中表达, 表明该基因不仅有抑制肌肉生长的作用, 还参与其他生命活动的调节。

**关键词:** 瘤背石磺; 肌肉生长抑制素; 基因克隆; 组织表达; RACE

**中图分类号:** Q 785; S 968.2

**文献标志码:** A

石磺科(Onchidiidae)隶属于软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、肺螺亚纲(Pulmonata)、石磺总科(Onchidioidea), 全身裸露无壳, 具有较高的营养价值和经济价值, 主要生活在浅海、滩涂潮间带甚至潮上带, 呈现一个从海洋向陆地扩展的梯度分布状态<sup>[1-3]</sup>。我国东南沿海广泛分布的几种石磺中, 以湿地陆栖生活为主的瘤背石磺(*Onchidium struma*)是石磺科中最具两栖性的种类, 其神经系统发达, 分布广泛。近年来关于石磺科贝类的研究已逐步深入, 其线粒体基因组<sup>[4-5]</sup>、群体多样性分析<sup>[6]</sup>以及分子标记开发<sup>[7]</sup>的研究已经比较透彻, 但关于性状相关功能基因的研究少有报道。石磺的真皮含有大量纵横排列的肌纤维, 能显著增强皮肤的弹性

和韧性, 提高石磺对环境的适应性<sup>[8]</sup>, 但石磺生存环境的差异往往导致石磺不同组织肌肉的含量、致密程度以及含水量<sup>[9]</sup>都存在较大差异, 因此研究石磺肌肉生长相关基因能够为石磺从海生到陆生的适应性研究提供一定的分子依据, 同时为石磺规模化增养殖提供理论参考。

肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)又称为GDF-8 (growth differentiation factor-8), 是近年来研究极为广泛的一类具有抑制肌肉生长功能的生长调控因子, 是转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )超家族的一员。大量的研究表明, MSTN的功能在不同种属间高度保守, 主要是抑制成肌细胞的增殖, 是抑制肌肉生长发育的重要调控因子; 它的突变或缺失会导致肌细

收稿日期: 2016-08-07 修回日期: 2016-10-19

资助项目: 国家自然科学基金(41276157); 上海高校水产学一流学科建设

通信作者: 沈和定, E-mail: hdshen@shou.edu.cn

胞的增生和肌纤维的肥大<sup>[10]</sup>。MSTN作为一种分泌型多肽要经过两次蛋白酶解活化:第一次是将分泌所需的N端信号肽移除,第二次是在蛋白酶水解加工位点(RXXR)切割成N端前肽和C端成熟肽两个肽段。C-端多肽通过二硫键相连形成二聚体,然后和膜上的特异性受体发生相互作用将信号传入细胞核,继而发挥其生物学作用<sup>[11-12]</sup>。

虽然MSTN的研究已成为热点,但主要集中在家畜<sup>[13-15]</sup>、硬骨鱼<sup>[16-17]</sup>和双壳贝类<sup>[18-21]</sup>,在石磺科贝类中还未见相关的报道。目前,海湾扇贝(*Argopecten irradians*)<sup>[18]</sup>,栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)<sup>[19]</sup>,缢蛏(*Sinonovacula constricta*)<sup>[20]</sup>等的MSTN都已被克隆出来,与其他动物类似;双壳贝类MSTN氨基酸序列都有信号肽序列、保守的半胱氨酸残基和RXXR蛋白水解位点等特征,与在哺乳动物中的表达模式不同;MSTN在鱼类和双壳贝类的各个组织中都有广泛的表达,暗示该基因的生物学功能具有多样性,并且其表达量还受到多种因素的影响。本实验选择在我国分布广泛且研究最为深入的瘤背石磺作为研究对象,以石磺科贝类转录组数据库为基础,比较分析后筛选、克隆了瘤背石磺MSTN基因的cDNA全长,并研究其在不同组织中的表达,为今后研究MSTN基因的表达规律提供基础资料,也为进一步分析石磺科贝类的肌肉生长规律以及探究海洋无脊椎动物从海洋到陆地的适应性进化过程奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用瘤背石磺为野生成体,采自上海市崇明岛,于2015年5月份带回实验室仿生态箱中暂养,每天投喂适量的玉米粉,加水保持箱内的湿度,定期清理粪便和尸体。实验进行前体质量(10.68±0.11)g,肌肉舒展状态下体长(5.82±0.12)cm。

### 1.2 方法

**RNA提取和cDNA合成** 采用Trizol(TaKaRa,大连)试剂提取总RNA,提取方法参照使用说明,用Nanodrop 2000(Thermo Scientific,美国)检测提取的RNA浓度并用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。以瘤背石磺腹足总RNA为

模板,用SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech,日本)按照操作指南合成RACE cDNA第一条链。

**MSTN基因克隆** 根据本实验室已有的瘤背石磺转录组数据库,通过基因差异表达分析、GO功能显著性富集分析和KEGG Pathway显著性分析,从转录组数据库中筛选出一条与肌肉生长相关的关键序列(S\_Unigene16644\_c0\_seq2),在NCBI进行BLAST比对,结果为MSTN基因。利用Primer Premier 5.0软件设计引物MSTN-F1、MSTN-R1(表1)扩增目的片段,25 μL体系为10×PCR Buffer 2.5 μL, dNTP Mixture(各2.5 mmol/L) 0.5 μL,上下游引物(10 μmol/L)各1 μL, Taq(5 U/μL) 0.3 μL, ddH<sub>2</sub>O 18.7 μL, cDNA 1 μL。PCR反应程序:94 °C预变性4 min; 94 °C变性30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35个循环; 72 °C延伸10 min。扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后,用胶回收试剂盒(天根,北京)割胶回收目的条带,并与pGEM-T Easy(Promega,美国)载体连接构建重组质粒,热转化感受态DH5α大肠杆菌后涂布于含氨苄的选择性培养基,37 °C过夜培养,经蓝白筛选和菌液PCR检测后将阳性克隆送往上海生工公司测序。

根据获得的MSTN基因序列,分别设计3'和5'RACE特异性引物(表1),按照Clontech RACE说明书分别进行3'RACE和5'RACE扩增,PCR反应产物经电泳、胶回收、连接和转化后,通过菌落PCR,挑选阳性克隆样品送上海生工测序,将所获序列和已知序列进行拼接,获得MSTN基因的全长,最后根据全长序列的3'和5'非编码区设计基因特异性引物MSTN-confirm-F和MSTN-confirm-R验证全长序列,并通过重测序消除不确定碱基。

**序列分析** 在NCBI上利用在线ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)查找开放阅读框(ORF);使用ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测编码蛋白的理化性质;NetPhos 2.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)预测蛋白质磷酸化位点;NetNGlyc 1.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测糖基化位点;Signal 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽序列;用Phyre2程序(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)预测蛋白质的二级结构和三级结构;ClustalX软件进行氨基酸序列多重比对;用MrBayes-

表 1 本研究用到的引物序列

Tab. 1 Sequence of primers used in this study

引物名称 primer	引物序列 sequence (5'-3')	引物用途 usage
MSTN-F1	CTCATCTTTGTTTCTCCCTT	片段验证引物
MSTN-R1	CTGCTCCACCAACTCCA	片段验证引物
MSTN-3'RACE Outer	CGTCCCAGGCATTTGTTGGTTGA	3'RACE特异性引物
MSTN-3'RACE Inner	CAAGAACCTTCCGTCACAGGCATT	3'RACE特异性引物
MSTN-5'RACE Outer	CCGTCCCAGGCATTTGTTGGTTGA	5'RACE特异性引物
MSTN-5'RACE Inner	CGACTCGGTGGAGTTGGTGAGCA	5'RACE特异性引物
MSTN-confirm-F	ACGGACACCAACTAACAAGC	序列全长验证
MSTN-confirm-R	TTTAACACCAAACGACGGAT	序列全长验证
MSTN-RT-F	ACTTCTGATTCTGAGGGA	目的基因定量引物
MSTN-RT-R	TTTGTTGTTTGAGGTGCT	目的基因定量引物
18s-RT-F	TGTCTCCTGCCCTACCTGTT	内参基因定量引物
18s-RT-R	ATTCCATGCGCAATTATTCA	内参基因定量引物

3.2.6和MEGA 6.0软件采用邻位法(Neighbor-Joining)构建系统进化树, 1000次bootstraps, 其他参数均使用默认值。

**实时荧光定量RT-PCR** 实验前随机挑选9个目测健康、大小均一的瘤背石磺, 分别取其背部皮肤、腹部皮肤、口球、腹足、肝胰腺、蛋白腺、两性腺和肺囊8个组织, 将每3个个体的相同组织等量混合作为一个样品, 共制成3个样品组, 提取总RNA并将其反转录为cDNA,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

根据已获得的MSTN基因序列, 设计荧光定量引物MSTN-RT-F、MSTN-RT-R(表1), 以18S rRNA为内参。实时荧光定量PCR采用SYBR premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒(TaKaRa, 大连)在Bio-Rad CFX-96(Bio-Rad, 美国)实时荧光定量PCR仪上进行。采用25  $\mu\text{L}$ 反应体系, 包括Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (2 $\times$ ) 12.5  $\mu\text{L}$ 、上下游引物(10 mol/L)各1  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu\text{L}$ 及模板cDNA 2  $\mu\text{L}$ 。其中每个样品的目的基因和内参基因分别进行3次技术重复。反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  35 s, 40个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 65~95  $^{\circ}\text{C}$ 获得熔点曲线。将cDNA模板以5为单位进行6个梯度的稀释, 用于制作目的基因和内参基因的标准曲线。采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法<sup>[22]</sup>计算目的基因的相对表达量。基因的表达量用平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SE)来表示, 使用SPSS 19.0进行单因素方差分析(One-

Way ANOVA),  $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 MSTN cDNA的全长序列

瘤背石磺MSTN的cDNA (GenBank登录号: KX668363)全长为2667 bp, 包括1650 bp的开放阅读框, 374 bp的5'端非翻译区(UTR), 643 bp的3'端非翻译区(UTR)(图1)。3'UTR区含有典型的多聚核苷酸加尾信号序列AATAAA和Poly (A)尾巴, C端活性区具有典型的TGF- $\beta$ 功能结构域。NCBI进行Blast比对, 结果显示该序列与加州海兔(*Aplysia californica*)和光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)有很高的同源性。

### 2.2 MSTN的结构特征

推导该序列共编码549个氨基酸, 分子质量约为63.27 ku, 理论等电点为6.02。丝氨酸(Ser)、天冬氨酸(Asp)和亮氨酸(Leu)含量最高, 分别为8.40%、7.80%和7.70%; 色氨酸(Trp)、半胱氨酸(Cys)和组氨酸(His)含量最少, 分别为1.80%、2.00%和2.20%(表2)。带负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)79个, 带正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)72个。脂肪族氨基酸指数为68.40, 原子总量8776, 分子式为C<sub>2774</sub>H<sub>4331</sub>N<sub>783</sub>O<sub>862</sub>S<sub>26</sub>。不稳定指数为52.44, 总平均疏水性为-0.73。

结果显示, 信号肽切割位点位于第21和

表 2 瘤背石磺MSTN多肽链的氨基酸组成

Tab. 2 Amino acid composition of MSTN from *O.struma*

氨基酸 amino acid	含量 content	百分比/% percentage	氨基酸 amino acid	含量 content	百分比/% percentage
Ala (A)	31	5.6	Leu (L)	42	7.7
Arg (R)	38	6.9	Lys (K)	34	6.2
Asn (N)	23	4.2	Met (M)	15	2.7
Asp (D)	43	7.8	Phe (F)	18	3.3
Cys (C)	11	2.0	Pro (P)	31	5.6
Gln (Q)	29	5.3	Ser (S)	46	8.4
Glu (E)	36	6.6	Thr (T)	35	5.4
Gly (G)	21	3.8	Trp (W)	10	1.8
His (H)	12	2.2	Tyr (Y)	21	3.8
Ile (I)	27	4.9	Val (V)	26	4.7

22个氨基酸残基, 表明N-端具有一个由21个氨基酸组成的信号肽; 磷酸化位点有31个Ser, 10个Thr,

9个Tyr; 有6个N糖基化位点。该基因总共有11个半胱氨酸残基, 其中有9个在蛋白水解加工位点(RSRR)之后的C端多肽生物活性区。Phyre2分析表明, MSTN肽链的二级结构主要以 $\beta$ 折叠和 $\alpha$ 螺旋为主, 三级结构预测如图2。

### 2.3 同源性分析

为分析瘤背石磺MSTN的进化地位, 根据MSTN氨基酸序列(表3), 使用MrBayes-3.2.6和MEGA 6.0构建了包括瘤背石磺在内的19个物种22条MSTN氨基酸序列的系统进化树(前者为MrBayes所得数据, 后者为MEGA 6.0数据)。进化树结果显示, 无脊椎动物和脊椎动物分为两支, 瘤背石磺和加州海兔的MSTN聚类成一个分支, 然后与光滑双脐螺聚在一起, 栉孔扇贝, 海湾扇贝和缢蛭聚在一起, 随后这两个分支又与美洲地蟹(*Gecarcinus lateralis*)聚类; 脊椎动物硬骨鱼的MSTN聚在一起, 人(*Homo sapiens*)和黑猩猩(*Pan*

```

1  acatgggagaatgatctcgcgcccgtgcacagaaaaagagctggttcgttgtcaacatcg
60  ggagaacggacaccaactaacaagccagtgaaatcggaagacgttacattgaaccagtg
120 ctatcataatgaagtgggtgctagcctttcgatgattgatgcacaaactgttccggccag
180 ccaattgctaagggactcgacggaccgcaagtgggagttggtttgttctactttttgtcg
240 tcttgtttgcccgttcccataaaagaccagcaagtgcagagattcagttataagaagaa
300 acgatcactgtgttgcaacggtgggacggcctcctcgggtgggataatattgccacttaaa
1  M S T P I L H A L T A L F I F
360 gacgctggggggactATGTGACGCCAATACTACATGCCCTTACTGCACTTTTCATCTTC
16  L L V A E A N V R P W H E K A I H D N R
420 CTGCTGGTGGCTGAGGCCAACGTGCGTCCCTGGCAGCAGAAAGCCATACACGACAACCGT
36  P R L R I Q G Q L R E D E Q Q Q D F S D
480 CCACGATTGAGAATTC AAGGGCAACTCCGTGAAGATGAACAGCAGCAAGATTT CAGTGAC
56  G G Y G Q S L D R L P L K D D A K E V F
540 GGGGATACGGTCAAAGTCTTGATCGACTGCCCTCAAAGATGACGCCAAAGAAGTGTTTC
76  R R Y E E K L S Q D E L T M N T P A A W
600 AGGAGATACGAAGAGAACTGTCGACGAGCAATGACAATGAACACACCAGCTGCTTGG
96  S K P Q N Q V S P Q R E A D S S I E K Q
660 TCAAACACAGAACCAAGTATCTCCCAAAGAGAGGCCGACTCTAGTATTGAAAAACAA
116 N H D Q I Y V Q N K L P E K T E K Q E V
720 AACCATGATCAAATTTATGTTCAAACAACTGCCGAAAAGACAGAGAAGCAGGAAGTA
136 K S K S E Q T N T D S V P L Q A E E A K
780 AAAAGTAAAAGTGAACAACTAATACAGACTCAGTTCCATTACAAGCTGAGGAGGCTAAA
156 N S T S A E F W A Q V D E D D N T T L S
840 AATTCGACGTCTGCAGAATTTGGGCCAGGTCGATGAAGATGACAACACAACCTTTGAGC
176 H G N F S V E H S T S D S E G N S S T S
900 CACGGTAACTTTTCGGTAGAACATTCCACTTCTGATTCTGAGGGAAACAGCTCAACGTCC
196 L R D A R C P T C R M R D D D R I Y R I
960 TTACGAGATGCCCGCTGCCCGACCTGTCGAATGCGAGACGACGATCGAATATAACCGCATC
216 E H L K Q Q I L S T L Q I K K L P N A T
1020 GAGCACCTCAAACAACAAATTTCTAAGTACTCTCAAATAAAAAAAGTCCCAATGCCACT

```

(图1 Fig. 1)

```

236 G V S I P K V P A L A H L Y E M D S D M
1080 GGGGTGTCCATCCCCAAGGTTCCGGCATTGGCACATCTATATGAGATGGACTCCGATATG
256 M S D S P Y K K R T N K G Y G G R D H D
1140 ATGAGTGATTCTCCGTACAAGAAGAGGACCAACAAAGGCTATGGAGGGCGTGATCACGAT
276 D Y D Y E E D F I V K T E R V F T I A R
1200 GATTATGACTATGAGGAGGACTTCATTGTCAAAAACGGAACGTGTATTACAATTGCGAGA
296 P A P M D R H F N L T D S V Y F S P P I
1260 CCAGCTCCAATGGATCGCCACTTCAATCTGACCGATTCCGGTATATTTCTCACCTCCTATA
316 Q L Y T S K I K T A Y L W F Y I R K V D
1320 CAACTGTACACTTCCAAAATCAAAACAGCGTATCTGTGGTTCACATTTCGTAAGTGGAC
336 T R R P F I T L T V E R I L P E S V A G
1380 ACGAGAAGGCCCTTCATCACACTCACTGTTGAGCGCATCCTGCCCGAGTCTGTGGCAGGA
356 Q R L M T K T V F S Q K L F R D K A F G
1440 CAGAGGCTCATGACCAAGACTGTCTTCTCTCAAAAACGTTTCAGAGACAAAGCTTTTCGGT
376 W K R I D M R N T V R Q W V K H P I L N
1500 TGGAAACGCATTGACATGAGAAATACCGTCAGACAATGGGTCAAGCATCCCATTCTCAAC
396 Y G L K M R A E D D A G N N L I V L P P
1560 TACGGCTTGAAGATGCGGGCGGAGGACGATGCTGGGAATAACTTAATAGTCCTGCCCCCA
416 S A D L D K G Y E P W L D T R I E E P R
1620 TCAGCAGACCTTGACAAAGGCTATGAGCCATGGCTGGACACCAGGATTGAAGAGCCAAGG
436 S N S R S R R S D A L V C S T N S T E S
1680 TCCAACAGCCGGAGCCGTCGTAGCGATGCCCTGGTCTGCTCCACCAACTCCACCGAGTCG
456 R C C R Y P L Y V G F A E F G W D W I I
1740 AGATGCTGCAGGTATCCCCTGTACGTGGGCTTCGCCGAATTCGGCTGGGACTGGATCATC
476 A P T H V K A D Y C S G E C R M S M Q D
1800 GCCCCGACTCACGTCAAAGCCGACTATTGCTCGGGGAGTGTCCGATGAGCATGCAAGAC
496 S T P Y S W I N Q Q M P G T E G S C C T
1860 TCGACCCCCTACAGTTGGATCAACCAACAAATGCCCTGGGACGGAAGGTTCTTGTGTACG
516 P T K M S A L P L L Y F D E S M N V L Y
1920 CCCACCAAAATGTCCGCTCTACCCCTGCTCTACTTTGACGAGTCCATGAATGTTTTGTAT
536 Q I L Q N I K V D K C G C A *
1980 CAGATTCTACAAAACATTAAGTGGACAAATGTGGCTGCGCTTAAaaatctagtaagacg
2040 ctgcttgcaggacgcttggaacggtgtgtcggcgatctattattattattaatattactat
2100 catttgcgtccgtgtaaaactaatgcagtatctgtctgttgtacgtggtgttgggtgtgt
2160 gtaattgtgtgaacgcttgtgtgaaagagaacgaaataatctacctaggagtgaacgtac
2220 actgagtgacttgggatggaagtgagagacaccgctacagatggcaagtcagtgagttag
2280 aggcaataatggcagacgggctacaactgagtggtgaaagggagaaacaaagatgagaa
2340 agaataaaatatgcgtggaaatccgcagtggtcaccacaagggccataggttctcgttg
2400 aggatacacggacggttacagtgagcctgtgacaaccttggagaggagatgaaaagctgt
2460 ggaaacgacacgatattatacaaatatacatgaaaatgacctacacgcaataggggtttg
2520 ggtgatctgagaagagcaagtgcaaaagaaatccgtcgtttggtgttaaatcagtggt
2580 gtattaccgataggtgggaggaaagaacaaacagagagaagagagagagagagagaaag
2640 aaagagagagagagaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 瘤背石磺MSTN cDNA序列和推测的氨基酸序列

基因序列编码区用大写字母表示，非编码区用小写字母表示。单下划线表示信号肽序列，双下划线表示TGF-β结构域，波浪线表示AATAAA加尾信号和Poly(A)尾巴。方框内表示蛋白酶水解位点，阴影部分为保守的半胱氨酸残基

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *O.struma* MSTN

The UTR and ORF regions are shown in lowercase and uppercase letters, respectively; underline is the deduced signal peptide; TGF-beta domain is double underlined; The putative eukaryotic polyadenylation signal(AATAAA) and polyadenylation signal is shown in wavy line; The proteolytic processing site (RKKR) is boxed; the shadow is the conserved cysteine residues (Cys)

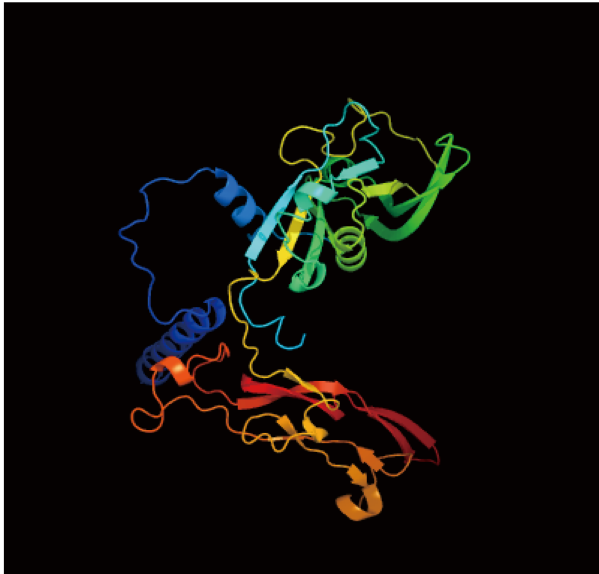


图 2 预测的瘤背石磺MSTN三级结构

Fig. 2 MSTN in *O.struma* tertiary structure predicted

*troglydotes*)的MSTN形成一个独立的分支(图3)。将瘤背石磺MSTN氨基酸序列与其他无脊椎动物的MSTN氨基酸序列进行多重比对,发现在TGF-β结构域氨基酸相似性较高(图4)。

### 2.4 不同组织的表达差异分析

以18S rRNA为内参基因, 荧光定量PCR检测瘤背石磺MSTN基因在背部皮肤、腹部皮肤、口球、腹足、肺囊、肝胰腺、蛋白腺、两性腺8个组织中的表达, 结果显示: MSTN基因在各个组织中均有表达; 在肝胰腺中的表达量最高, 腹足表达量最低, 且表达差异显著( $P<0.05$ ); 含肌纤维各组织中的表达量要低于各内脏器官的表达量, 腹部皮肤的表达量最低(图5)。

### 3 讨论

本研究首次使用RACE技术成功克隆得到瘤

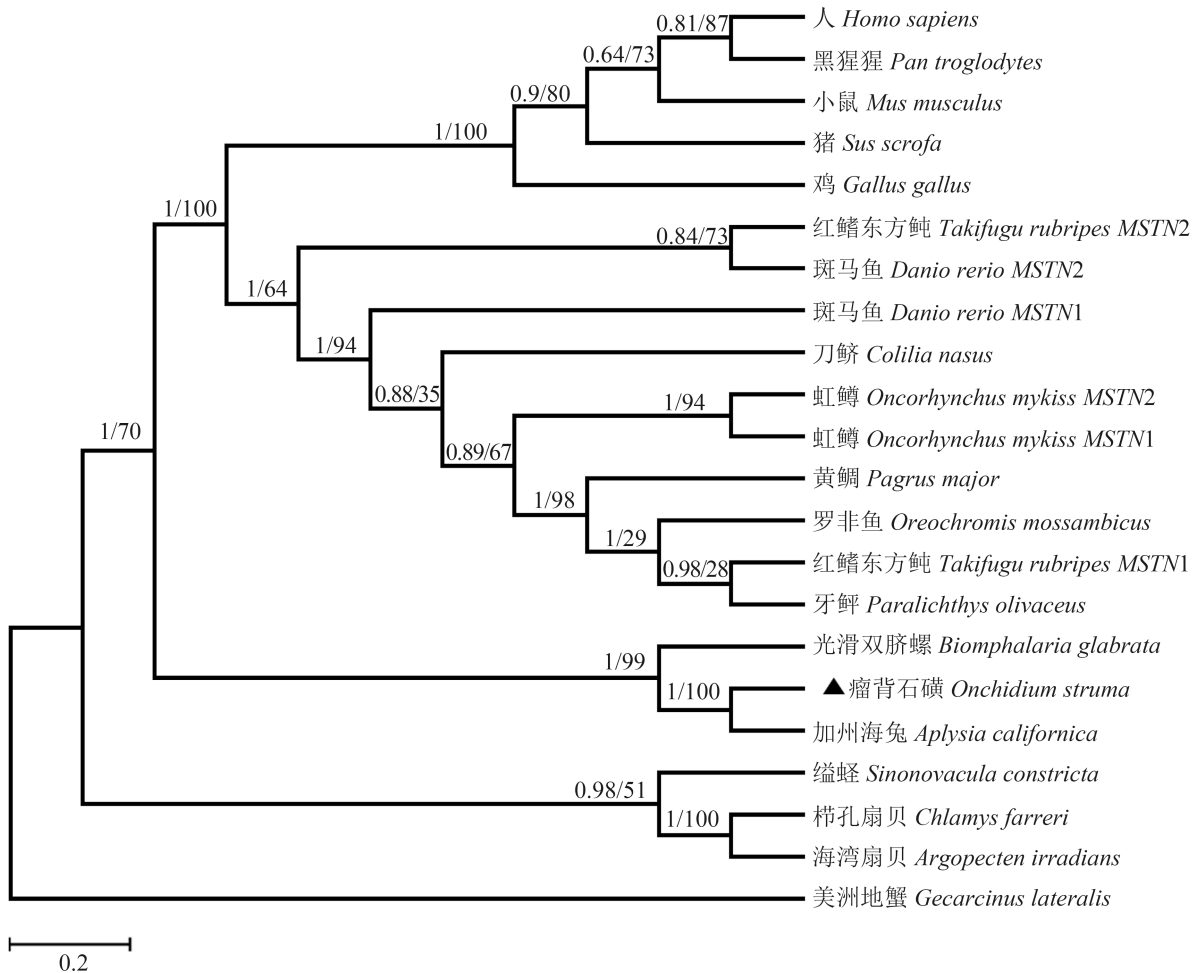
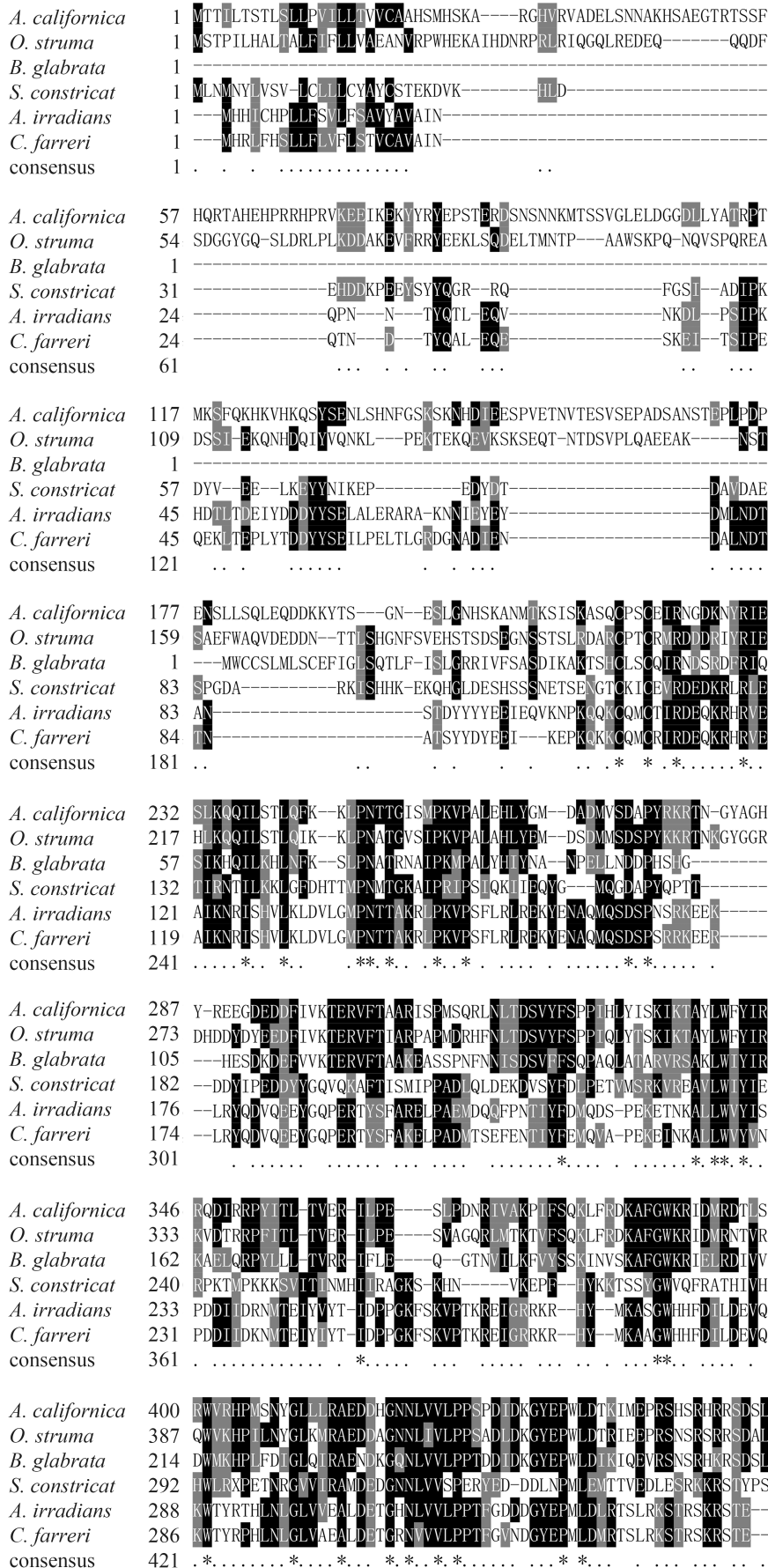


图 3 基于MSTN氨基酸序列构建的贝叶斯系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree generated using the Bayesian analysis of *O.struma* MSTN and other reported MSTN sequences



(图4 Fig. 4)

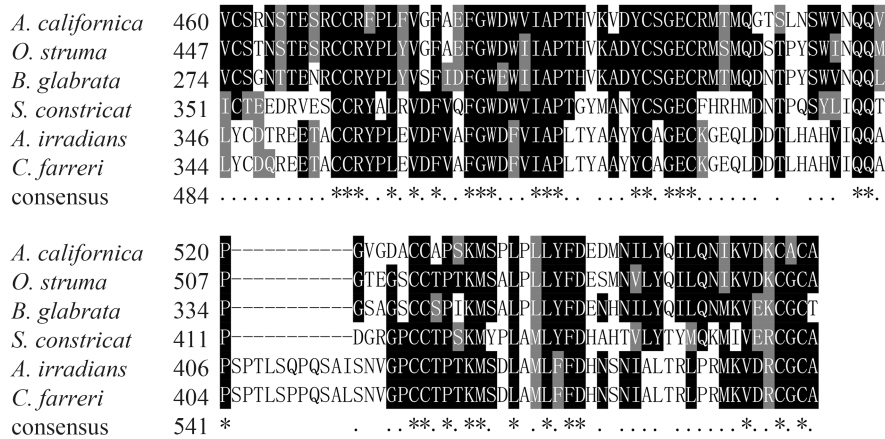


图 4 瘤背石磺MSTN和其他物种MSTN氨基酸序列的多重比对

“\*”表示保守的氨基酸残基, “.”表示相似性氨基酸

Fig. 4 Alignment of the deduced amino acid sequences of *O.struma* MSTN and other reported MSTN sequences

“\*” indicates highly conserved amino acid residue; “.” represents similar amino acid

表 3 其他物种MSTN的NCBI登录号  
Tab. 3 GenBank accession numbers of MSTN used in this study

物种 species	登录号 accession no.
人 <i>Homo sapiens</i>	NP_005250.1
黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	NP_001073388.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_034964.1
猪 <i>Sus scrofa</i>	ADQ74915.1
鸡 <i>Gallus gallus</i>	AAR18244.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> MSTN1	AY258034
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> MSTN2	AY687474
罗非鱼 <i>Oreochromis mossambicus</i>	AAK28706
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	ABD65405.1
刀鲚 <i>Coilia nasus</i>	KF638401
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> MSTN1	AAR88255
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> MSTN2	AAR88254
虹鲟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> MSTN1	AF273035
虹鲟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> MSTN2	AF273036
黄鲷 <i>Pagrus major</i>	AAX82170
光滑双脐螺 <i>Biomphalaria glabrata</i>	XP_013068893.1
加州海兔 <i>Aplysia californica</i>	XP_005093969.1
缢蛭 <i>Sinonovacula constricta</i>	KC763815
栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	EU563852
海湾扇贝 <i>Argopecten irradians</i>	JN684903
美洲地蟹 <i>Gecarcinus lateralis</i>	ACB98643.1

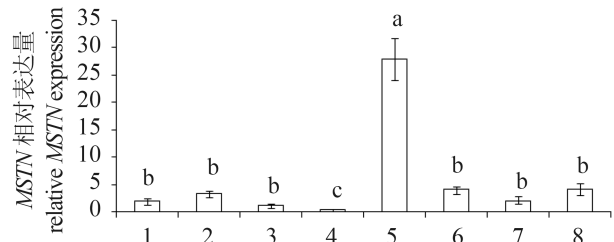


图 5 MSTN在瘤背石磺不同组织的表达情况

1. 背部皮肤, 2. 腹部皮肤, 3. 口球, 4. 腹足, 5. 肝胰腺, 6. 蛋白腺, 7. 两性腺, 8. 肺囊; 相同字母表示差异不显著( $P>0.05$ ), 不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Fig. 5 RT-qPCR analysis of the expression profiles of *O.struma* MSTN in different tissues

1. dorsal skin, 2. abdominal skin, 3. buccal mass, 4. foot, 5. hepatopancreas, 6. albumen gland, 7. digenetic gonad, 8. lung sac; Same letters above the bars indicate no significant differences ( $P>0.05$ ), Statistical significance is presented by different letters ( $P<0.05$ )

背石磺MSTN基因并进行了分析, MSTN在物种间的高同源性, 说明该基因在进化上非常保守, 也意味该基因具有非常重要的生物学功能。进化树分析结果表明瘤背石磺MSTN与腹足纲几种无壳贝类的亲缘关系较近, 与物种的分类地位相似, 也与Liu等<sup>[4-5]</sup>的研究结果相符。瘤背石磺与加州海兔的MSTN均较其他几种贝类的MSTN氨基酸序列长约80~100个氨基酸, 这也许暗示了贝类从有壳到无壳的进化过程中可能有一个进化事件发生, 使得无壳贝类的该基因序列变长。

研究发现, MSTN表达量在不同物种中有明显的差异, 推测其生物学功能也有不同。MSTN只在哺乳动物的部分组织中表达<sup>[23]</sup>, 但在水生



物中发现其在各组织广泛表达。杜富宽等<sup>[24]</sup>研究结果显示, *MSTN*基因在刀鲚(*Coilia nasus*)肌肉和脑中呈高表达, 推测鱼类*MSTN*基因不仅能够抑制肌肉生长, 还可能参与神经系统的调节。史钧信等<sup>[25]</sup>发现蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*) *MSTN*在鳃、肝和肾中表达较高, 在肌肉中表达较低, 并且推断*MSTN*在低等脊椎动物中的作用更加多样。Guo等<sup>[18]</sup>首次在海湾扇贝的血淋巴中发现有*MSTN*基因的表达, 推测*MSTN*基因的表达与机体免疫功能相关。瘤背石磺*MSTN*基因在成体瘤背石磺的各个组织中均有表达, 说明该基因不仅能抑制肌肉生长, 可能还具有其他生物学功能: 在肌肉组织中低表达, 负调控作用弱, 有利于肌肉组织的生长; *MSTN*在内脏组织中的高表达, 抑制了内脏器官中肌肉的形成和生长, 同时推测该基因的功能可能还与肝胰腺的解毒作用有关。

*MSTN*的表达量还受到生物生长阶段以及环境等多种因素的影响。Liu等<sup>[26]</sup>研究了*MSTN*在大黄鱼(*Larimichthys crocea*)不同生长阶段的表达变化状况, 发现*MSTN*在鱼的不同生长阶段表达量存在显著差异, 同时饥饿也会对表达量产生影响; 徐建勇等<sup>[27]</sup>发现在6月龄的饱食牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)眼和肾脏组织中检测到高表达, 肌肉中低表达。本实验所用瘤背石磺处于生长期, *MSTN*负调控作用弱, 表达量低, 与瘤背石磺生长规律相吻合, 成熟期瘤背石磺*MSTN*在肌肉组织中的表达量可能较高。在某些鱼类的*MSTN*基因中存在着两种基因型, 包括虹鳟<sup>[28]</sup>、金鲷(*Sparus aurata*)<sup>[29]</sup>、斑马鱼<sup>[30]</sup>, 但在其他脊椎动物和软体动物中并未发现类似的报道, 两种基因型的出现被认为与进化过程中基因组倍增事件相关<sup>[31]</sup>。金鲷*MSTN1*型基因在骨骼肌、心肌和脂肪组织上都有表达, *MSTN2*型基因几乎只在中枢神经系统中表达, 由此石磺*MSTN*基因的组织表达模式类似于*MSTN1*型, 现有的研究结果并不能确定瘤背石磺中是否存在两种基因型。

刘欣与史艳梅为同等贡献第一作者。

#### 参考文献:

[1] 吴旭峰, 沈和定, 吴文健, 等. 我国华东沿海4种石磺形态学比较[J]. 动物学杂志, 2010, 45(6): 92-100.  
Wu X F, Shen H D, Wu W J, et al. Comparison on

Morphology of Onchidiidae in Eastern Coast of China[J]. Chinese Journal of Zoology, 2010, 45(6): 92-100(in Chinese).

- [2] Bouchet P, Rocroi J P. Classification and nomenclator of gastropod families[M]. Malacologia: International Journal of Malacology (Hackenheim, Germany: ConchBooks), 2005, 47(1): 1-397.
- [3] Dayrat B. Review of the current knowledge of the systematics of Onchidiidae(Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) with a check list of nominal species[J]. Zootaxa, 2009, 2009(2068): 1-26.
- [4] Liu C, Wei L L, Shen H D, et al. Complete mitochondrial genome of *Peronia verruculata* (Gastropoda: Pulmonata: Systellommatophora: Onchidiidae)[J]. Mitochondrial DNA, 2015, 26(5): 753-754.
- [5] Liu C, Shen H D, Zhou N. Complete mitochondrial genome of *Platevindex* sp. (Gastropoda: Pulmonata: Systellommatophora: Onchidiidae)[J]. Mitochondrial DNA: The Journal of DNA Mapping, Sequencing, and Analysis, 2016, 27(2): 918-920.
- [6] 姚理想, 周娜, 沈和定, 等. 中国沿海平疣桑椹石磺 COI基因的遗传多样性与遗传分化[J]. 中国水产科学, 2015, 22(4): 729-739.  
Yao L X, Zhou N, Shen H D, et al. Genetic diversity and differentiation of *Platevindex mortoni* from the coastal area of China based on mitochondrial COI gene[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(4): 729-739(in Chinese).
- [7] 吴欣, 沈和定, 王冬凤, 等. 基于Illumina HiseqTM 2000高通量转录组测序的里氏拟石磺SSR标记开发[J]. 海洋科学, 2015, 39(11): 20-25.  
Wu X, Shen H D, Wang D F, et al. Development of microsatellite markers for *Paraoncidium reevesii* based on transcriptome sequencing Illumina HiseqTM 2000[J]. Marine Sciences, 2015, 39(11): 20-25(in Chinese).
- [8] 王成暖, 沈和定, 郑培. 中国沿海瘤背石磺不同地理群体遗传多样性的ISSR标记研究[J]. 生物技术通报, 2014(9): 208-212.  
Wang C N, Shen H D, Zheng P. Evaluation of genetic diversity in the *Onchidium struma* from different geographical populations in China by inter simple sequence repea(ISSR)[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(9): 208-212(in Chinese).
- [9] 管菊, 沈和定, 钱静, 等. 四种石磺营养成分分析及价

- 值评价[J]. 食品工业科技, 2013, 34(17): 349-364.
- Guan J, Shen H D, Qian J, *et al.* Analysis and evaluation of nutritive composition of four species of Onchidiidae[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(17): 349-364(in Chinese).
- [10] McPberron A C, Lawler A M, Lee S. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a low TGF-superfamily member[J]. Nature, 1997, 387(6628): 83-90.
- [11] Moustakas A, Souchlnylskyi S, Heldin C H. Smad regulation in TGF- $\beta$  signal transduction[J]. J Cell Sci, 2001, 22(5): 4359-4369.
- [12] Thomas M, Langley B, Berry C. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, function by inhibiting muoblast proliferation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(51): 40235-40243.
- [13] Mcpherron A C, Se-JinLee. Suppressionm of body fat accumulation in MSTN-deficient mice[J]. Journal of Clinical Investigation, 2002, 109(5): 595-601.
- [14] Sharma M, Kambadur R, Matthews K G, *et al.* Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated incardiomyocytes after infarct[J]. Journal of Cellular Physiology, 1999, 180(1): 1-9.
- [15] Ji S, Losinski R L, Cornelius S G, *et al.* Myostatin expression in porcine tissues: Tissue specificity and developmental and postnatal regulation[J]. Ameican Journal of Physiology, 1998, 275(4): 1265-1273.
- [16] Galt N J, Froehlich J M, Remily A E, *et al.* The effects of exogenous cortisol on myostatin transcription in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Comparative Biochemistry and Pheisology-Part A: Mol Integr Physiol, 2014, 175(1): 57-63.
- [17] Ostbye T K, Wetten O, Tooming-Klunderud A, *et al.* Myostatin (*MSTN*) gene duplications in Atlantic salmon (*Salmo salar*): evidence for different selective pressure on teleost MSTN-1 and -2[J]. Gene, 2007, 403(1/2): 159-169.
- [18] Guo L, Li L, Zhang S D. Molecular cloning and characterization of the myostatin gene in a cultivated variety of bay scallop, *Argopecten irradians*[J]. Aquaculture, 2012, 350-353(2012): 192-199.
- [19] Hu X L, Guo H H, He Y, *et al.* Molecular characterization of myostatin gene from zhikong scallop *Chlamys farreri* (Jones et Preston 1904)[J]. Genes and genetic systems, 2010, 85(3): 207-218.
- [20] Niu D H, Wang L, Bai Z, *et al.* Identification and expression characterization of the myostatin (*MSTN*) gene and association analysis with growth traits in the razor clam *Sinonovacula constricta*[J]. Gene, 2015, 555(2): 297-304.
- [21] Núñez-Acuña G, Gallardo-Escárate C. The myostatin gene of *Mytilus chilensis* evidences a high level of polymorphism and ubiquitous transcript expression[J]. Gene, 2014, 536(1): 207-212.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] McPherron A C, Lee S J. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice[J]. Journal of Clinical Investigation, 2002, 109(5): 595-601.
- [24] 杜富宽, 聂志娟, 徐钢春, 等. 刀鲚*MSTN*基因的克隆及其组织表达[J]. 中国水产科学, 2014, 21(4): 684-692.
- Du F K, Nie Z J, Xu G C, *et al.* Cloning and tissue expression of the *MSTN* gene in *Coilia nasus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(4): 684-692(in Chinese).
- [25] 史钧信, 薛良义, 黄红丽, 等. 蓝点马鲛*mstn*克隆及表达分析[J]. 生物学杂志, 2015, 32(6): 12-16.
- Shi J X, Xue L Y, Huang H L, *et al.* Cloning and expression analysis of *mstn* in *Scomberomorus niphonius*[J]. Journal of Biology, 2015, 32(6): 12-16(in Chinese).
- [26] Liu Z F, Xue L Y, Sun S, *et al.* Myostatin-2 isolation and spatiotemporal expression comparison between myostatin-1 and -2 in *Larimichthys crocea*[J]. Genes genomics, 2014, 36(5): 599-609.
- [27] 徐建勇, 陈松林. 牙鲆肌肉生长抑制素(MSTN)基因克隆[J]. 水产学报, 2008, 32(4): 497-506.
- Xu J Y, Chen S L. Cloning and expression analysis of the myostatin (*MSTN*) gene in *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(4): 497-506(in Chinese).
- [28] Roberts S B, Goetz F W. Differential skeletal musele expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms[J]. FEBS Lett TOC, 2001, 491(3): 212-216.
- [29] Maceatrozzo 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.
- [30] Amali 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 myostatin2[J]. Developmental Dynamics, 2003, 229(4): 847-856.
- [31] Ostbye T K, Galloway T F. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues[J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 265(20): 5249-5257.

## Cloning and tissue expression analysis of the *MSTN* gene in *Onchidium struma*

LIU Xin, SHI Yanmei, WANG Dongfeng, SHEN Heding\*, YANG Tiezhu, LI Jie, LI Bohang  
(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In this study, we used rapid amplification cDNA ends (RACE) methods to obtain the full-length cDNA of Myostatin gene in *Onchidium struma*. The bioinformatic analysis and expression pattern of *MSTN* mRNA in different tissues detected by Real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) were performed. The full length of *MSTN* cDNA sequence consists of 2667 base pairs (bp), comprising a 374 bp 5' untranslated region (UTR), a 643 bp 3'UTR, and a 1650 bp open reading frame (ORF) which encodes 549 amino acids. The *MSTN* protein was predicted to contain 8776 atoms and its formula is  $C_{2774}H_{4331}N_{783}O_{862}S_{26}$ , with a calculated relative molecular weight of 63.27 kD and pI of 6.02. The result of signal peptide prediction shows that the N-terminal has a signal peptide of 21 amino acids length. The common features were found in *MSTN* of *O. struma*, including a conservative hydrolytic site (RSRR) and 9 cysteine residues. The phylogeny analysis shows that the relationship between *O. struma* and *Aplysia californica* was the closest. According to RT-PCR results, *MSTN* gene was expressed in various tissues with the highest expression in the hepatopancreas and lowest in foot; expression in muscle is lower than that in internal organs, and expression in muscle of abdominal skin is higher than other parts. Our results suggest that *MSTN* gene may play an important role in muscle growth and development in *O. struma*, and may provide useful information for further studies on evolution of marine invertebrates from sea to wetland.

**Key words:** *Onchidium struma*; *MSTN*; gene clone; tissue expression; RACE

**Corresponding author:** SHEN Heding. E-mail: hdshen@shou.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41276157); Shanghai University Fisheries Science First-class Subjects Construction Project