

家鹅 *Myostatin* 基因 3'-UTR 序列分析

杨凤萍¹, 王金玉^{2*}, 陈义权², 李其松², 耿士忠¹, 张柳², 沈华²

(1. 扬州大学生物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘要: 利用家鹅 *Myostatin* 基因第 3 外显子设计上游引物、家鸡 *Myostatin* 3'-UTR 设计下游引物, PCR 扩增并克隆出家鹅该基因 3'-UTR 长 1 064bp DNA 序列。该序列具有一个 polyA 加尾信号序列(TAATAAA), 并富含连续的 TTTT 高保守区。分析家鹅与其他 12 个物种该序列的同源性发现, 其与家鸡的同源性最高, 达 87.1%, 与鱼类的最低(<11%)。以 13 个物种 *Myostatin* 3'-UTR 构建的分子进化树表明, 3'UTR 能够为动物进化提供一定信息, 但适用于较低分类阶元。

关键词: 家鹅; *Myostatin* 3'-UTR 分析; 进化

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)06-0550-05

Sequence Analysis of 3'-UTR of *Myostatin* Gene in Domestic Goose

YANG Feng-ping¹, WANG Jin-yu^{2*}, CHEN Yi-quan², LI Qi-song²,
GEN Shi-zhong¹, ZHANG Liu², SHEN Hua²

(1. College of Bioscience and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: A 3'-untranslated region (UTR) DNA sequence (1 064bp) of *Myostatin* gene in goose was obtained by PCR, using forward primer devised by *Myostatin* gene of the goose and reverse primer devised by *Myostatin* gene of the chicken. It has a polyA tail-signal sequence (TAATAAA) and high-frequency TTTT sequences (a kind of high conservative region). Compared with 12 other species' same gene sequence, it has the highest homology with chicken (up to 87.1%) and the lowest homology with fishes (down to 11%). The phylogenetic tree constructed by 3'-UTR of *Myostatin* genes in these 13 species shows that 3'-UTR sequence can offer certain information for animal's evolution.

Key words: domestic goose; 3'-UTR analysis of *myostatin* gene; evolution

1997年, McPherron等通过简并引物 PCR 法首次鉴定并证实了 *Myostatin* 基因(又称 MSTN 或 GDF-8)属于转化因子 β 超家族成员, 发现其仅在骨骼肌中特异表达, 对骨骼肌生长有负调控作用^[1]。随着对该基因研究的逐步深入, 逐渐揭示了牛、鼠等一些动物个体的“双肌”之谜。目前对小鼠、猪、牛、鸡、一些鱼类的 *Myostatin* 基因结构、生物学功能以及表达特异性等已有所认知, 但有关鸭、鹅等水禽 *Myostatin* 基因的研究报道较少, 仅有的研究也仅局限于对编码序列的分析, 对 3'-UTR、5'-UTR 研究几乎未见报道。

本研究拟对家鹅的 *Myostatin* 基因 3'非编码区(UTR)序列进行研究分析, 以进一步了解水禽 *Myostatin* 基因 3'-UTR 序列结构的特点, 探究其能否为动物的进化提供一定的信息, 为全面展开水禽 *Myostatin* 基因研究提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

PCR 引物由上海 BIOASIA 公司合成, 克隆载体 pGEM-T、*Taq* 酶购自上海 BIOASIA 公司;

收稿日期: 2005-08-05

基金项目: 农业科技成果转化资金(04EFN21320099); 江苏省高校自然科学基金计划(05KJB230159)

作者简介: 杨凤萍(1969-), 女, 江苏姜堰人, 博士生, 讲师, 主要从事动物遗传育种与繁殖学研究

* 通讯作者: 王金玉, 男, 江苏盐城人, 教授, 博导, E-mail: jywang@yzu.edu.cn; Tel: 0514-7979075

EcoR I、*Sal* I、Pyrobest™ DNA Polymerase 和 marker DL2000、 λ DNA/*Hind* III 购自宝生物工程大连有限公司,测序反应由宝生物工程大连有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 扬州鹅翅静脉采血,酚/氯仿/异戊醇法抽提基因组 DNA,TE 溶解后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。DNA 纯度检测时的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 在 1.7~1.8 之间。

1.2.2 引物设计 由于没有现成的有关家鹅 *Myostatin* 基因 3' UTR 序列报道,因此本研究应用 Primer Premier V5.0 引物设计软件进行引物的设计。根据 GenBank 中鹅 *Myostatin*(AF440862)第 3 外显子设计 2 个上游引物 (F_1 : 5'-GGATGGACTGGATTATCGCACCTA-3'; F_2 : 5'-GC-CCACCAACAAGATGTC-3');根据鸡 *Myostatin*(AF346599) 3'-UTR 设计 3 个下游引物 (R_1 : 5'-ACCAGGAAAGTATGTTATGAAGAGA-3'; R_2 : 5'-TCA ACCAACGAT GTC -3'; R_3 : 5'-CTACCTGTGGTTTAC -3')。

1.2.3 PCR 反应体系及程序 PCR 扩增体系为:10 \times buffer 2.5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 2.2 μL , 10 mmol/L dNTP 1.0 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物 1.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 1.5 μL , Pyrobest™ DNA Polymerase 0.2 μL , 模板 1.0 μL , 加双蒸水至 25 μL 。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 8min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 克隆测序 将 PCR 产物与 pGEM-T easy vector 于 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜,转化 $\text{DH}_5\alpha$ 感受态细胞,接着涂含有 AmpR (氨苄青霉素) 的筛选平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 12~16 h,挑白斑,接种培养,再用菌液 PCR (以菌液直接为模板,其它成分同 PCR 反应体系) 初步鉴定,再抽提质粒,进行质粒 PCR 及酶切鉴定,最后用 pGEM-T vector 的通用引物 M13 进行测序。

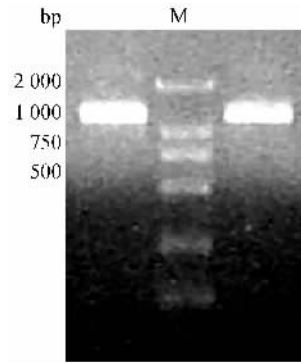
1.2.5 基因序列分析及分子系统进化树的构建 EditSeq 软件进行 DNA 序列编辑, MegAlign 软件进行序列比较分析, Clustal W 软件进行聚类及分子系统进化树的构建。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物及回收

由于引物扩增具有严格的碱基配对性,且下游

引物应用鸡的基因序列设计,因此由两个上游引物和 3 个下游引物组成的 6 对引物中,仅引物 F2/R1 扩增成功。根据 GenBank 中家鸡的序列推断,目的片段长度应为 1 200 bp 左右。从图 1 中可以看出,扩增产物条带清晰,无任何杂带,且片段大小与预测的相符。利用 V-GENE DNA 凝胶回收试剂盒进行目的片段的纯化和回收。



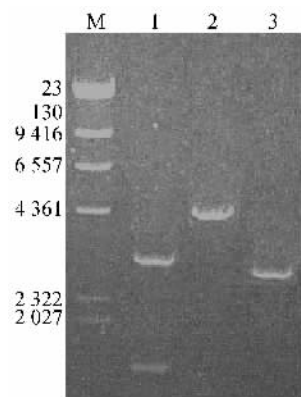
M. DL2000 DNA marker

图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR

2.2 克隆鉴定

对克隆所得的 *Myostatin* 重组子 PCR 鉴定能扩增出目的片段;用 *EcoR* I, *Sal* I 限制性内切酶进行酶切,出现如图 2 所示的目的片段,说明所得克隆结果是正确的。



M, λ DNA/*Hind* III DNA 分子量标准;1. *EcoR* I;2. *Sal* I;3. Cloning plasmid

M, λ DNA/*Hind* III DNA marker;1. *EcoR* I;2. *Sal* I;3. Cloning plasmid

图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid digested with restriction endonucleases

2.3 测序结果及分析

图 3 为去除部分第 3 外显子序列后的鹅 *Myostatin* 基因 3'-UTR 扩增序列测序结果 (GenBank 登录号为 DQ291134)。通过与 GenBank 中家鸡该基因序列 (AF346599) 的 3'-UTR 比较,发现两者具有 87.1% 的同源性,进一步表明测序结果的正确

性。分析测序结果,序列中 A+T 的含量明显偏高,为 65.23%,而 G+C 只有 34.77%。在家鹅的 3' 区域 1 048~1 054 bp 处有一个 polyA 加尾信号序列 (TAATAAA)。另外,和几乎所有物种 *Myostatin* 基因一样,在其 3'-UTR 序列内富连续的 TTTT 重复的高保守区。

```

GACCGTCGTGAGATCCACCACTTCATAAATTGTGGAAGCTACCAAAAAAGTTATATCCC 60
CTCACCCATCTTTGAAACTGTGAAGTTACGTGCGCTAGGCATTGCCGACATCATAGGCTG 120
TATGATAGCCTATCATAACAGCCAGATTTAGAGCAACACAAGCTGCAGAACGCGAACTAA 180
AAGACAATAGAGTTGCCTAATGACTGGTTATTAACCAGTGGAAAAAGAAAATCTACAATC 240
AAAAACACCGGATTTAACCAATGAGTTTCTTACATTTTGGAGGAATCAATATTCAGTCAT 300
TCAGACACAAATCCATACGCAGGTTTCAACGTATGTTTGTAAATCAAAGCAAGCTCCTTC 360
TCATCTGCAAAATAGAAGGAGCAGGCTTTTAAATCAATTTCTTCACAGCTTCACTTGCTAT 420
TGCATTTACAGAAAAATATATACCGGTAACATATACACCACTCCACAATACCACCAGAAT 480
CATCCTTAAACACTTGAATATATAGTGCGAATTTGTGAAATGCATAAGACGAAAATCCAC 540
GTAAATGGACAAATCCTGAAATTAGGGATGGTAGTGTATTTAGCGTGTTCATTCTTTT 600
TTTTTCGTTAGTATGATAGTAATCAATGGCAATGGTGTACTTAAGCAGGCTGAGTAAAT 660
AGAAAGATAGTTATCTAAGTGAAGAATTTAGAGTAATAATGAATTTGCCCTATCCTCAG 720
GTACACTATTCAACATTCGCAAGAAATAGCTATTTTTTAAATGAAGGTGAATAGTTTTTCT 780
AGATGTAGTAGAACAAAAGGCAGCAGAGAAGTCTAACTTTCAAACATAATCCCACACCA 840
TAATCTGCCTTTGCAACATTACCGTTTGCCTATGATAAACCAATGCAAATAGTTGGTTG 900
CTACAGATATTGTTAAAAAACCACTTTGATATAACTGATTTGTGTAATATGTATGCATCA 960
ATATTTTTGTAATAAATGTTTATTTTTTAATCACTGTTGGTATATGTTTCATCACAAGAAA 1 020
AGAATGATGTTAACCTGTACTTTAGTTTAATAAAACAAAACCAA 1 064

```

“——”. 加尾信号序列;“……”. 富“TTTT”序列
 “——”. Putative tail-signal sequences;“……”. Denoted high frequencies“TTTT”sequences

图 3 鹅 *Myostatin* 3'-UTR 测序结果

Fig. 3 The sequence of 3'-UTR fragment of *Myostatin*

2.4 分子系统进化树的构建

利用 GenBank 中已具有的奶牛、牦牛、猪、人、家鼠 5 种哺乳动物、家鸡及大西洋鲑、美洲红点鲑、斑马鱼、真鲷、黄鳍鲷、石首鱼等 6 种鱼类 *Myostatin* 基因 3'-UTR 部分序列构建分子系统进化树 (如图 4)。图中,奶牛和牦牛先聚为一类后与猪聚在一起,再与人聚在为一类,最后和家鼠聚为一类;家鹅和家鸡的聚类后再与上述各哺乳动物聚在一起。大西洋鲑与美洲红点鲑聚类后与斑马鱼聚在一起与上述各类聚在一起。真鲷与黄鳍鲷聚为一类后与石首鱼聚在一起,再与上述各类聚在一起。

从表 1 可以看出,家鹅与家鸡 *Myostatin* 与哺乳动物的次之,在 62.1% (猪)~55.5% (奶牛) 之间

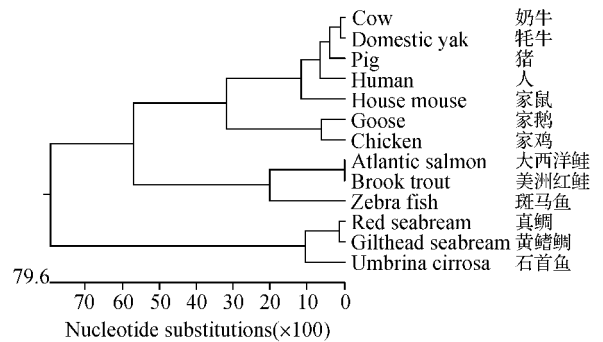


图 4 13 个物种 *Myostatin* 基因 3'UTR 分子系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic Tree of 3'-untranslated region of *Myostatin*

每个谱系内得以保留,因而在资料相对较少的情况下,应用基因 3'-UTR 也可为揭示生物的进化进程提供一定的帮助。

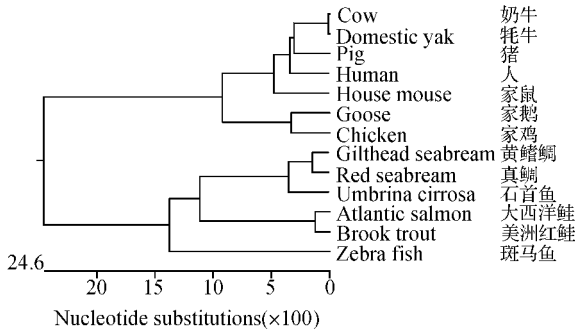


图 5 13 个物种 *Myostatin* cDNA 分子系统进化树

Fig. 5 The phylogenetic tree of cDNA of *Myostatin*

本试验所用 13 个物种的 *Myostatin* 3'-UTR 序列为 GenBank 所提供,目的片段大小存在一定的差异,对聚类结果会有或多或少的影响。另外仅凭基因中的一个片段或一个基因组提供的进化信息量是有限的,并不能完全反映动物的真实进化过程。只有使用多个不同来源或不同功能的适用基因序列、基因翻译序列,与传统的形态性状(如体尺)、血液生化指标、各种 RNA(如 rRNA、tRNA)等联合起来分析,才能得到更多的、与生物进化进程相关的信息,从而获得更接近真实进化史的系统发育树,揭示生物进化之谜。

参考文献:

[1] Mepheron A C, Lauler A M. Regulation of skeletal muscle mas in mice by a new TGF-β superfamily member [J]. Nature,1997, 387(6 628) :83~90.
 [2] 邵武,姜先华,于蛟,等. 人和动物 SON 基因 3'非编码区的 PCR 测序分析[J]. 中国法医学杂志,2003, 18(2):87~89.
 [3] 江元清,凌毅,赵武玲. 真核 mRNA 的 3'非翻译区转录调控作用研究进展[J]. 植物学通报,2001, 18(1):3~10.
 [4] Wahle E, Keller W. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors [J].

Annu Rev Biochem, 1992,61 : 419~440.
 [5] Zhang L, Ge L, Parimoo S, et al. Human stearyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites [J]. Biochem J,1999, 340: 255~264.
 [6] 于政权,李岩,孟庆勇,等. 利用比较基因组学方法对猪 BAC DNA 序列分析来研究抑肌素基因的调控[J]. 中国科学 C 辑(生命科学),2004, 34(4): 364~375.
 [7] Joshi C P. Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants : a compilation and analysis [J]. Nucl Acids Res, 1987,15(23):9 627~9 640.
 [8] Andersson L, Archibald A, Ashburner M, et al. Comparative genome organization of vertebrates the first international workshop on comparative genome organization [J]. Mamm Genome, 1996, 7: 717 ~ 734.
 [9] 蔡禄. DNA 非编码区的进化[J]. 包头钢铁学院学报,1994, 13(1):26~29.
 [10] 蔡禄. 非编码核酸序列的最大信息量原理研究[J]. 包头钢铁学院学报,1994,13(4):7~16.
 [11] Curtis S E, Clegg M T. Molecular evolution of chloroplast DNA sequences [J]. Mol Biol Evol, 1984,1: 291~301.
 [12] Clegg M T, Gaut B S, Learn G H, et al. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:6 795~6 801.
 [13] 苏应娟,王艇,郑博,等. 根据 cpDNA trnL-F 非编码区序列变异分析黑桫椤海南和广东种群的遗传结构与系统地理[J]. 生态学报,2004,24(5):914~919.
 [14] 贺福初,吴祖泽. 分子进化规律与学说的理论综合及其验证与应用[J]. 中国科学基金,1995,(2):9~16.
 [15] 田欣,李德铎. DNA 序列在植物系统学研究中的应用[J]. 云南植物研究,2002, 24(2): 170~184.
 [16] 黎真,牛冬,阮晖,等. 猪、鸡、鸭 Myostatin 成熟区段 DNA 的克隆及其同源性分析[J]. 畜牧兽医学报,2005, 36(4):323~327.
 [17] Petit R J, Pineau E, Demesure B, et al. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 9 996 ~ 10 001.