

# 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因 RNA 干扰研究

孔庆辉<sup>1</sup>, 晁燕<sup>1</sup>, 夏明哲<sup>2</sup>, 祁得林<sup>1\*</sup>

(1. 青海大学 农牧学院动物科学系, 西宁 810016; 2. 青海大学 生态环境工程学院, 西宁 810016)

**【摘要】** 目的 利用反义寡核苷酸技术抑制肌肉生长抑制素(myostatin, *MSTN*)的表达,评估 *MSTN* 基因的沉默效果,并检测 RNA 干扰后对下游基因的影响。方法 通过构建黄河裸裂尻鱼(*Schizopygopsis pylzovi*) *MSTN* 基因 RNA 干扰(RNAi)重组腺病毒载体 1P3(DSP *MSTN* 273 + 250 + 1737)和 1P2(DSP *MSTN* 195 + 1670),并将其注射黄河裸裂尻鱼肌肉组织,进行活体 RNA 干扰;利用 real-time PCR 和 Western blotting 评估 *MSTN* 基因的沉默效果,并检测 *MSTN* 基因 RNA 干扰后肌肉肌酸激酶(muscle-type creatine kinase, *M-CK*)基因转录水平的调控作用。结果 real-time PCR 分析结果表明,与 HK 组(病毒通用阴性对照组)和 N 组(空白对照组)相比,重组腺病毒载体 1P3 对黄河裸裂尻鱼肌肉 *MSTN* 基因的转录具有明显的干扰作用( $P < 0.05$ ),抑制率达 53.5%;而重组腺病毒载体 1P2 对 *MSTN* 基因的转录无明显干扰作用( $P > 0.05$ )。Western-blotting 分析结果与 real-time PCR 结果相一致。同时,经 1P3 干扰后随着 *MSTN* 基因转录水平的下降,其肌肉肌酸激酶 *M-CK* 基因表达水平显著上升。结论 通过 RNAi 技术能够有效的抑制 *MSTN* 基因的表达,并能够上调 *M-CK* 基因的表达量。因此,证明了在黄河裸裂尻鱼中 *MSTN* 能够抑制 *M-CK* 的转录。揭示高原土著鱼类 *MSTN* 基因的对肌肉的生长发育起到调控作用。

**【关键词】** 黄河裸裂尻鱼;RNA 干扰;肌肉生长抑制;肌酸激酶;表达

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)04-0344-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.04.003

## Inhibitory effect of RNA interference of *MSTN* gene expression on the downstream genes in *Schizopygopsis pylzovi*

KONG Qing-hui<sup>1</sup>, CHAO yan<sup>1</sup>, XIA Ming-zhe<sup>2</sup>, QI De-lin<sup>1\*</sup>

(1. Animal Science Department of Agriculture and Animal Husbandry College, Qinghai University, Xining 810016, China;

2. College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016)

**【Abstract】 Objective** To investigate the silencing effect of RNA interference on *MSTN* gene (myostatin, *MSTN*) expression, and detect the effects on the downstream genes in *Schizopygopsis pylzovi*. **Methods** To construct the recombinant adenovirus vector 1P3 (DSP *MSTN* 273 + 250 + 1737) and 1P2 (DSP *MSTN* 195 + 1670) for RNA interference of the *MSTN* gene in *Schizopygopsis pylzovi*, and to conduct the RNA interference in vivo experiment by injecting the vector into the muscle tissue of *Schizopygopsis pylzovi*. Real-time PCR and Western blotting were used to evaluate the silencing effects on *MSTN* gene expression, and to detect the regulatory function of *M-CK* at gene transcription level after RNA interference of the *MSTN* gene. **Results** The result of real-time PCR showed that compared with the HK team (Virus general negative control group) and N team (blank control group), the 1P3 had significant interference effect on the *MSTN* gene transcription in *Schizopygopsis pylzovi* ( $P < 0.05$ ), with an inhibition rate of 53.5%, but the 1P2 had no significant interference effect on the *MSTN* gene transcription. The result of Western blotting was consistent with the results of real-time PCR. At the same time, after the 1P3 interference, the level of *MSTN* gene transcription was declined, and the level of *M-*

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 31160226; No. 31460094)。

[作者简介] 孔庆辉(1990-),女,在读硕士研究生,研究方向:基础兽医。E-mail: kc1008611@163.com

[通讯作者] 祁得林,男,博士,教授;研究方向:动物分子遗传与生态学。E-mail: delinqi@126.com

CK gene expression was significantly increased. **Conclusions** Our results demonstrate that the expression of *MSTN* gene can be effectively suppressed, and the expression of *M-CK* gene can be up-regulated through the RNA interference. Therefore, it proves that *MSTN* gene can inhibit the transcription of *M-CK* gene in *Schizopygopsis pylzovi*, and reveals the regulatory role of *MSTN* gene in the muscle growth and development in the plateau fish *Schizopygopsis pylzovi*.

**[Key words]** *Schizopygopsis pylzovi*; RNA interference; Myostatin; Creatine kinase; Expression

Corresponding author: QI De-lin. E-mail: delinqi@126.com

黄河裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis pylzovi*) 隶属鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae), 在青藏高原东北部黄河干支流和湖泊以及柴达木水系中广泛分布<sup>[1]</sup>, 同其他裂腹鱼亚科鱼类一样, 黄河裸裂尻鱼具有性成熟迟、繁殖力低、生长期短、生长缓慢的典型生物学特性。加之受人类干扰和环境恶化的影响, 导致黄河裸裂尻鱼种群数量一再减少, 栖息地日益片段化<sup>[2]</sup>。鱼类肌肉组织是鱼类的组织结构和运动器官, 也是为人类提供食物的重要蛋白源。以鱼类为重要养殖对象的水产养殖和自然环境的保护, 实质上就是按照实际的生态环境和条件, 利用合适的技术, 最大限度的加快肌肉纤维细胞的快速增殖, 从而促使肌肉快速生长发育。所以, 鱼类在生长发育过程中肌肉的分化、生长是重要的环节, 受许多环境、激素和分子水平等因素的调控。在分子水平上, 除了通过与肌肉分化和生成有关的正向调控的生肌决定因子外<sup>[3]</sup>, 肌肉的生长还受到一些负调控因子, 特别是肌肉生长抑制素 (myostatin, *MSTN*) 的影响<sup>[4]</sup>。

肌肉生长抑制素, 又称 GDF-8 (growth differentiation factor 8), 是 1997 年由 Mcperron 等<sup>[4]</sup> 发现在骨骼肌的发育和生长中特异性表达且功能比较专一的肌肉负调控因子, 属于转化因子  $\beta$  (transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ) 超家族中的一员。*MSTN* 同 TGF- $\beta$  超家族的其他成员一样, 在近 N-末端的前肽序列具有疏水性, 是分泌用信号肽序列; N-末端和 C-末端之间的蛋白酶水解加工位点 (RXXR) 以及 C-末端的成熟肽活性区。成熟肽在被切割后可负向调节肌肉的生长发育, *MSTN* 前肽在骨骼肌中可与 *MSTN* 成熟肽结合, 抑制 *MSTN* 成熟肽的活性, 促进肌肉的生长。有研究表明, *MSTN* 基因过度表达, 将通过下调肌肉肌酸激酶 (muscle-type creatine kinase, M-CK) 的活性, 可逆的抑制生肌的过程。同时, 降低 *MSTN* 的表达水平, 可以提高 *M-CK* 的转录, 从而促进生肌过程<sup>[5]</sup>。肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 能够催化二磷酸腺苷 ADP 和磷酸肌酸之间磷酸基的可逆转移<sup>[6]</sup>, 是一个存在于动物的脑组

织、心脏及骨骼肌的细胞质和线粒体中的重要激酶, 与细胞内能量转运、能量代谢、肌肉收缩密切相关<sup>[7,8]</sup>。2014 年王景圆等<sup>[9]</sup> 研究发现, 肌肉细胞中 *Rheb* 基因上调可以引起 *MSTN* 表达量的上调, *M-CK* 有不同程度的下降。肌肉中 *MSTN* 基因的变化能够引起 *M-CK* 不同程度的变化。所以, 肌肉肌酸激酶不仅参与能量代谢过程, 还与个体发育过程中肌肉的生长有密切联系<sup>[5,10,11]</sup>。

国内外很多学者将目光投向了 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术。从 20 世纪 90 年代, Carolyn 研究组发现矮牵牛花瓣的深紫色的决定因素是花青素<sup>[12]</sup>, 到 1995 Guo 等<sup>[13]</sup> 从线虫中发现 RNA 干扰现象。RNA 干扰都是研究功能基因的有力工具。1997 年首次在小鼠骨骼肌中发现了该基因, 通过基因敲除的方法发现敲除 *MSTN* 基因的小鼠骨骼肌重量大幅度增加。对 *MSTN* 基因敲除的小鼠研究发现, 脂肪沉积能力随着年龄的增加而降低<sup>[4]</sup>。通过对小鼠<sup>[14,15]</sup>、鱼类<sup>[16,17]</sup>、鸡<sup>[18,19]</sup>、猪<sup>[20]</sup> 和牛<sup>[21]</sup> 的 *MSTN* 基因及其多克隆的抗体的研究表明, 利用肌肉生长抑制素的拮抗物可以有效的阻断肌肉生长抑制素的分子通路, 并且能够有效地促进动物肌肉的生长和发育。本研究以黄河裸裂尻鱼为研究对象, 通过前期获得的肌肉生长抑制素基因序列设计引物, 构建获得反义寡核苷酸序列。利用反义寡核苷酸技术抑制 *MSTN* 基因表达, 获得相关数据, 为突破高原冷水鱼类生长缓慢的瓶颈、推动土著鱼类的保护利用研究提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样本采集

黄河裸裂尻鱼共 24 尾, 雌性各半, 体重为 25.01 ~ 15.33 g。采集于青海省大通县湟水河支流—宝库河 (37°14'24.72''N, 101°28'36.12''E)。将野外采集得到的样品, 迅速带回实验室。通过外观、解剖、显微镜检查选择其体型体态体色正常、无疔疮、无囊肿、无充血、无出血、无溃疡、无寄生虫或

胞囊及其他病理变化的鱼。在实验室饲养 3 d 适应其环境,为后续实验做准备。

### 1.1.2 主要仪器与试剂

小型垂直电泳槽 (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad); 小型 Trans-Blot 转印槽 (Bio-Rad); 全蛋白提取试剂盒 (生工生物工程有限公司); Pierce (R) BCA Protein Assay Kit (碧云天生物技术公司); Tris-base (Biotopped)、SDS (Wolsen); 冰乙酸、甲醇、异丙醇、氯化钠 (均为:天津市富宇精细化工); Tris-HCl (pH 8.8; 1.0 M)、Tris-HCl (pH 6.8; 1.5 M)、AP、TEMED、4 × 蛋白上样缓冲液、Tween-20、考马斯亮蓝、PVDF 膜、Pierce ECL Western Blotting Substrate、甘氨酸 (均为:Solarbio); 蛋白 marker、RNAprep Pure Tissue Kit、SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)、FastQuant RT Kit (Tiangen Biotech Co., Ltd); 封闭用脱脂奶粉、Anti-GAPDH (Sigma)、辣根酶标记山羊抗

兔 IgG (中杉金桥)、Anti-MSTN (上海英基生物); KOD FX (TOYOBO)、HEK 293 (ATCC)、内切酶 BsaI、XbaI (TaKara)、Metafectene™ (Biontix 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 构建 shRNA 重组腺病毒载体

##### (1) 干扰质粒的构建

根据前期获得的黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因序列<sup>[22]</sup>, 利用晶赛公司 Adenovirus Expression System 重组腺病毒构建系统, 针对靶基因分别设计并合成两种 shRNA 干扰载体。针对 *MSTN* 基因编码区 (1 号: 273-292; 2 号: 250-268; 3 号: 1737-1755; 4 号: 1670-1688; 5 号: 195-215) 设计特异性插入片段序列。1P3: 在 1、2、3 号区域设计三条干扰片段; 1P2: 在 4、5 号区域设计两条干扰片段, 横线部位为基因特异性序列 (见表 1)。以 pGenesil-10 为底物进行重组 PCR, 获得干扰质粒。

表 1 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因 shRNA 干扰片段

Tab. 1 Sequences of shRNAs oligonucleotide for *MSTN* gene in *Schizopygopsis pylzovi*

干扰片段 RNAi	序列(5'—3') Sequences
DSP <i>MSTN</i> 273 + 250 + 1737-A	TTTGCTCTCCGTGGCTTCACTAGGTTTGGAGCCTGTTGAGTCTCGCTCACTGTCAAC
DSP <i>MSTN</i> 273 + 250 + 1737-B	TTTGCTCTCCCTGCAGGTTTGCTGAGAAATTTGGACCGTGTTCCTCTTTT
DSP <i>MSTN</i> 273 + 250 + 1737-C	TTTGCTCTCCCCACAGATGTAGGTTTGGAGCCTGTTGAGTCTGCCTACTGCCTCG
DSP <i>MSTN</i> 273 + 250 + 1737-D3	TTTGCTCTCTACCGAGGCTGTTTGACAAATGCGGGAAAGAGTGATCT
DSP <i>MSTN</i> 273 + 250 + 1737-E	GCAGTTTGCTGAGAAATTTGGGACTTTTTCAAAAA GCATTTGTCAAACAGCCCT
DSP <i>MSTN</i> 273 + 250 + 1737-F	GGTA AGGCTGTTTGACAAATGC TTTTGTAAAAA GTCCCAAATTCAGCAAA
DSP <i>MSTN</i> 195 + 1670-A	TTTGCTCTCCGTGGCTTCACTA GTCTGAACTCACATGTGGAAC TCGCTCACTGTCAAC
DSP <i>MSTN</i> 195 + 1670-B	TTTGCTCTCCCTGCAGG AGTGTGTGTGGAAGTTTGC GGTGTTTCCTCTTTT
DSP <i>MSTN</i> 195 + 1670-C	TTTGCTCTCCCCACAGATGTA GTCTGAACTCACATGTGGAAC CTGCCTACTGCCTCG
DSP <i>MSTN</i> 195 + 1670-D	TTTGCTCTCCGAG AGTGTGTGTGGAAGTTTGC TTTTAACTCTAGACCCAG

#### (2) 包装腺病毒载体

所需的 shRNA 表达框已成功构建在 pGenesil 上。从 pGenesil 上通过 LR 体外同源重组将 shRNA 表达框转移至有荧光蛋白的腺病毒表达载体 pad 上。用 DNA 纯化试剂盒 (天根) 提取质粒, 用 XbaI 单酶切进一步鉴定提取的质粒。准备进行转染的线性化腺病毒 DNA, 用 PacI 酶切重组腺病毒质粒。从而可以用 PacI 线性化的腺病毒 DNA 转染 HEK 293 和放大培养重组腺病毒, 检测重组腺病毒的滴度。

#### 1.2.2 黄河裸裂尻鱼活体注射重组腺病毒

将前期饲养并已适应实验室环境的黄河裸裂尻鱼, 进行分组: 1P3 组 (RNA 干扰组 1, 6 尾); 1P2 组 (RNA 干扰组 2, 6 尾); HK 组 (腺病毒通用阴性对照组, 6 尾); N 组 (正常空白对照组, 6 尾)。对 1P3

组和 1P2 组进行右侧背鳍部肌肉注射腺病毒载体溶液 20 μL, 重组腺病毒滴度为  $5.0 \times 10^{10}$  pfu/mL。在相同的时间点, 对 HK 组背鳍右侧肌肉注射相同量的空病毒载体溶液。N 组不做任何处理, 饲养条件同以上三组。在注射 10 d 后分取各组实验鱼右侧背鳍肌肉, 用 real-time PCR 和 Western blotting 检测 *MSTN* 的表达量, 分析干扰效率。

#### 1.2.3 Real-time PCR 检测 RNA 干扰后 *MSTN* 基因表达以及对下游基因 *M-CK* 的影响

分别取四组黄河裸裂尻鱼右侧背鳍部肌肉组织, 提取总 RNA, 利用 FastQuant RT Kit 试剂盒反转录合成 cDNA。依照 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 试剂盒进行 real-time PCR 分析。Real-time PCR 反应体系 20 μL; 2 × SuperReal PreMix Plus 10

$\mu\text{L}$ 、上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.6  $\mu\text{L}$ 、cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ 、 $\text{ddH}_2\text{O}$  8.4  $\mu\text{L}$ 。Real-time PCR 时,每份样品重复 3 次,*GAPDH* 为内参基因,引物见表 2。结果采用  $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$  法分析<sup>[23]</sup>。

表 2 黄河裸裂尻鱼 RNA 干扰分析引物

Tab. 2 Primers for the RNA interference analysis in *Schizopygopsis pylzovi*

引物名称 Primers	序列(5'—3') Sequences
MSTNrealF1	AATAATCCAGTCCCAGCCGAAG
MSTNrealR1	CCCAGCTCACCAAGCACAACA
M-CKrealF1	GACTAAGAAGTGCACAACG
M-CKrealR1	CCAACAGCCGTGGTGAGCGTAGA
GAPDH	GCGAGCCATGCCAGCAGACAA
GAPDH	GTGAAAACACCAGTAGACTCCACAACA

#### 1.2.4 Western-blotting 检测 RNA 干扰后 *MSTN* 基因的表达量

取 4 组黄河裸裂尻鱼背鳍部肌肉组织,利用全蛋白提取试剂盒,提取总蛋白质,依照 Pierce (R) BCA Protein Assay Kit 进行蛋白浓度测定。4 × 蛋白上样缓冲液与蛋白按照 1:3 的比例进行混合后,99℃ 变性 10 min, -80℃ 保存。统一上样量,利用 SDS-PAGE 试剂盒使用说明,配制 10% SDS-PAGE 进行电泳检测。60 V 恒压电泳 25 min 左右,样品到达分离胶与浓缩胶分界处时调整电压为 120 V 恒压电泳 65 min 左右。利用甲醛溶液浸泡 1 min 激活 PVDF 膜,用于转印。转膜时 100 mA 恒流转印 50 min 左右。将固定好的 PVDF 膜置于 5% TBST 配制的脱脂奶粉溶液,37℃ 封闭 2 h。将 PVDF 膜和 TBST 1:1000 配制好的一抗置于孵育袋 12 h。PVDF 膜洗涤 10 次,每次 6 min。置于 TBST 1-5000 配置好的二抗孵育液,室温孵育 2 h,用 TBST 洗涤 5 次,每遍 6 min。将蛋白转到 PVDF 膜,用 ECL 显色。以 *GAPDH* 为内参基因,进行胶片曝光。

## 2 结果与分析

### 2.1 腺病毒载体的构建

#### 2.1.1 shRNA 干扰载体的构建

1P3 载体以 pGenesil-10 为底物进行重组 PCR,获得 1P3 干扰质粒 PG10-3P-MSTN (Mir30 3' - DSP MSTN 273 - Mir30 5' - EGFP - CMV - U6 Promoter - DSP MSTN 250 - DSP MSTN 1737 - H1 Promoter)。1P2 载体,以 pGenesil-10 为底物进行重组 PCR,获得干扰质粒 PG10-2P-MSTN (Mir30 3' - DSP MSTN 195 - Mir30 5' - EGFP - CMV - U6 -

DSP MSTN 1670) (见图 1)。

#### 2.1.2 包装重组腺病毒

从 pGenesil 上通过 LR 体外同源重组将 shRNA 表达框转移至腺病毒表达载体 pad 上。提取质粒并用 XbaI 进行单酶切进一步鉴定提取的质粒,1% agarose 凝胶电泳。酶切结果分析:正确的克隆将切出一条约 2.5 kb 的小条带,且大条带大于 15 kb (说明载体为腺病毒载体),从上图可知目的克隆是正确的(见图 2)。目的重组腺病毒中有荧光蛋白真核表达框。所以,在 PacI 线性化的腺病毒 DNA 转染 HEK 293 和放大培养重组腺病毒的过程中有明显的荧光蛋白表达,即说明有感染能力的重组腺病毒包装成功(见图 3)。

### 2.2 Real-time PCR 检测黄河裸裂尻鱼 RNA 干扰后 *MSTN* 的相对表达量

Real-time PCR 分析结果表明,当以 N 组表达量作为参考时,1P3 和 1P2 组表达量分别是 N 组表达量的 0.465 和 0.89 倍。所以,与 HK 组和 N 组相比,重组腺病毒载体 1P3 对黄河裸裂尻鱼肌肉 *MSTN* 基因的转录具有明显的干扰作用 ( $P < 0.05$ ),抑制率达 53.5%;而重组腺病毒载体 1P2 对 *MSTN* 基因的转录无明显干扰作用 ( $P > 0.05$ ) (见图 4)。

### 2.3 Western-blotting 测定 RNA 干扰对 *MSTN* 蛋白相对表达情况

Western-blotting 结果表明,当以 N 组表达量作为参考时,1P3 和 1P2 组表达量分别是 N 组表达量的 0.479 和 0.765 倍。所以,与 N 组和 HK 组相比,重组腺病毒载体 1P3 对黄河裸裂尻鱼肌肉 *MSTN* 基因的转录具有明显的干扰作用 ( $P < 0.05$ ),干扰效率可达 52.1%。P2 组干扰效率不明显 ( $P > 0.05$ ) (见图 5)。

### 2.4 Real-time PCR 检测黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因 RNA 干扰后对下游基因 *M-CK* 的表达调控

经 1P3 干扰后随着 *MSTN* 基因转录水平的下降,其肌肉肌酸激酶 *M-CK* 基因表达水平显著上升 ( $P < 0.05$ ),以 N 组表达量作为参考时(见图 6),1P3 组 *M-CK* 表达量是 N 组表达量 2.437 倍。

## 3 讨论

本研究通过设计两种 shRNA 分别为 1P3 和 1P2,并成功包装成重组腺病毒。将重组腺病毒注射到黄河裸裂尻鱼右侧背鳍部,检测 RNA 干扰后 *MSTN* 基因的表达量。Real-time PCR 分析结果表

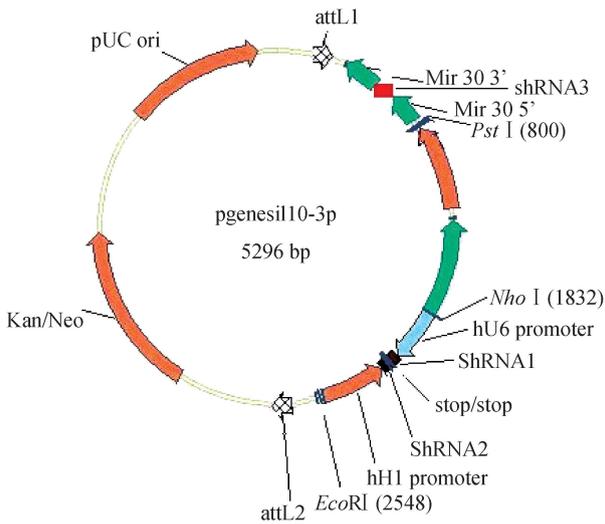
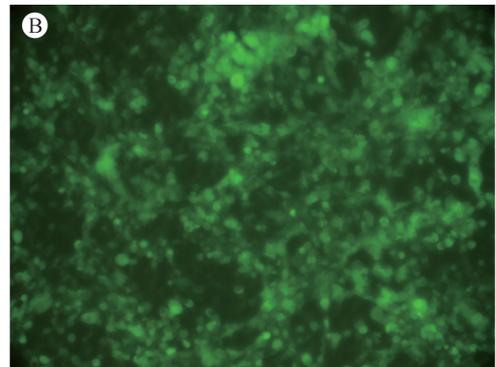
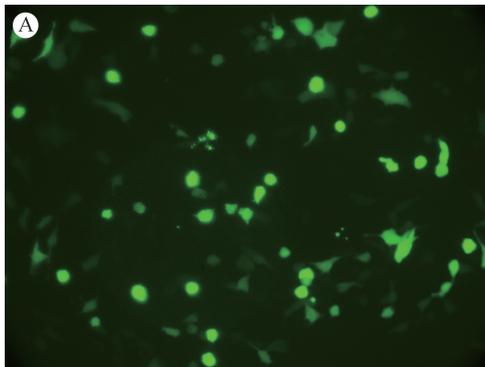


图 1 构建质粒图谱

Fig. 1 Construction of the plasmid profiles

明,与 HK 组和 N 组相比,重组腺病毒载体 1P3 对黄河裸裂尻鱼肌肉 *MSTN* 基因的转录具有明显的干扰作用 ( $P < 0.05$ ),抑制率达 53.5%;而重组腺病毒载体 1P2 对 *MSTN* 基因的转录无明显干扰作用 ( $P > 0.05$ )。Western-blotting 分析结果与 real-time PCR 结果相一致。表明, RNA 干扰后 *MSTN* 基因转录水平和翻译水平是一致的。经 1P3 干扰后随着 *MSTN* 基因转录水平的下降,其肌酸激酶 *M-CK* 基因表达水平显著上升。能够有效的干扰 *MSTN* 基因,这对今土著鱼的生长发育提供基础资料。有助于高原土著鱼类生态适应机制、保护生物学、发育生物学的深入研究。

肌肉的生长和发育除了与细胞分化因子 (myogenic differentiation, MyoD) 家族特异基因启动子上的 E-box 结合而激活肌肉特异蛋白的转录进而调控

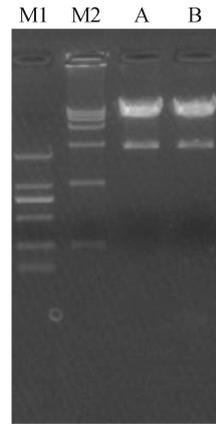


注:A:质粒转染后荧光显微镜图;B:扩大培养重组腺病毒后荧光显微镜图。

图 3 荧光显微镜检测腺病毒转染 HEK 293 细胞

Note: A: Plasmid transfection with fluorescence microscopy; B: Expanded culture of recombinant adenovirus with fluorescence microscopy.

Fig. 3 Adenovirus-transfected HEK 293 cells were detected by fluorescence microscopy



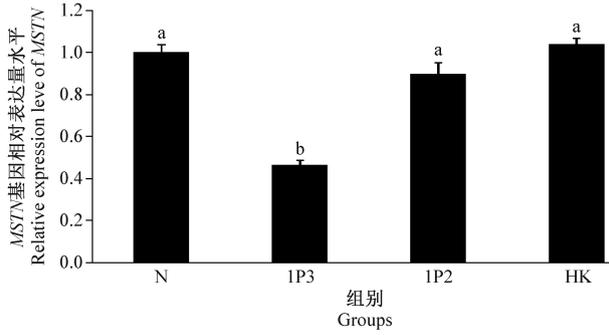
注:M1: 2000 marker (Takara): 从上到下依次为  $2 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^3$ 、750、500、250、100 bp; M2: 500 - 15 000 marker (Takara): 从上到下依次为: 15、8、5、2.5、1 kb; A: pad- DSP MSTN 273 + 250 + 1737 XbaI 单酶切鉴定结果; B: pad- DSP MSTN 195 + 1670 XbaI 单酶切鉴定结果。

图 2 shRNA 质粒 XbaI 单酶切检测

Note. M1: 2000 marker (Takara): 2 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp; M2: 500 - 15000 marker (Takara): 15 kb, 8 kb, 5 kb, 2.5 kb, 1 kb, 0.5 kb; A: pad- DSP MSTN 273 + 250 + 1737 XbaI single enzyme identification results; B: pad- DSP MSTN 195 + 1670 XbaI single enzyme identification results.

Fig. 2 Detection of shRNA plasmids using XbaI single enzyme digestion

肌肉分化和发育外,还受到特异性肌细胞增强子结合因子 2 (myocyte enhancer-binding factor 2, MEF2) 的调控。MEF2 能够在肌肉发育过程中介导细胞的分化,控制肌细胞分化过程中的基因转录,可与大多数肌肉的启动子和增强子直接结合而调控肌肉的发育<sup>[24]</sup>。转录因子 MEF2 的 DNA 结合位点是一段保守的序列,该序列广泛存在于肌肉组织特异性表达基因的调控区,MEF2 与 MyoD 基因家族成员具有

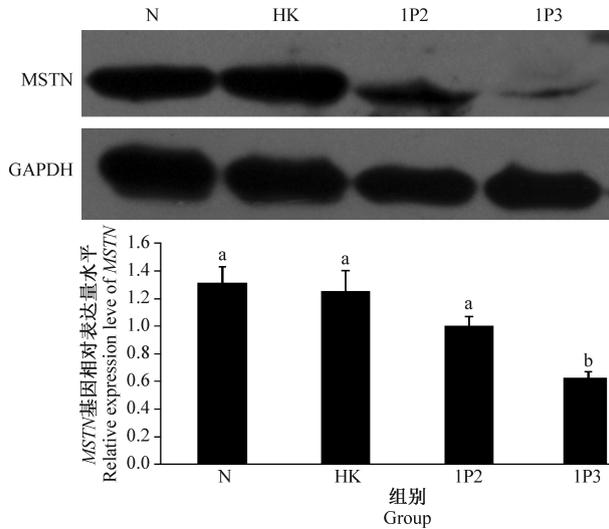


注:上标不同字母表示差异有显著性( $P < 0.05$ )。

图 4 RNA 干扰后肌肉组织 cDNA 样品中 MSTN 基因表达量

Note. Different letters in superscript indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

Fig. 4 Relative expression of MSTN gene in the cDNA samples of muscle after RNA interference



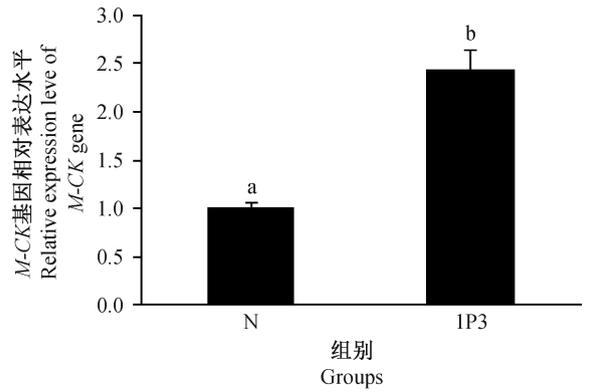
注:上标不同字母表示差异有显著性( $P < 0.05$ )。

图 5 RNA 干扰后黄河裸裂尻鱼 MSTN 蛋白的表达结果

Note. Different letters in superscript indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

Fig. 5 Expression of MSTN protein from *Schizopygopsis pylzovi* after RNA interference.

协同作用,共同调节肌肉发育<sup>[25]</sup>。由于 MEF2 具有 DNA 的结合活性,所以可与肌肉肌酸激酶基因启动子中的 A/T DNA 序列结合,能够调节肌肉的生长和发育<sup>[26]</sup>。肌肉肌酸激酶的另一重要生物学功能就是与动物骨骼肌的形成和生长有关, *M-CK* 作为 MyoD 和 MEF2 的下游靶基因,启动与肌细胞分化和肌肉生长有关的基因的表达<sup>[11]</sup>。同时,2002 年 Spiller 等<sup>[27]</sup>发现 *MSTN* 启动子序列上存在肌肉增强子因子 2 的结合位点,它们对 *MSTN* 基因的转录和表达起到一定的调控作用<sup>[27]</sup>。本研究通过对黄



注:上标不同字母表示差异有显著性( $P < 0.05$ )。

图 6 MSTN 基因 RNA 干扰后 *M-CK* 基因的相对表达量

Note. Different letters in superscript indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

Fig. 6 The relative expression of *M-CK* gene after RNA interference of *MSTN* gene

河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因进行 RNA 干扰后。结果表明,抑制 *MSTN* 基因的表达,在一定程度上能够上调 *M-CK* 基因的表达量。因此,证明了在黄河裸裂尻鱼中 *MSTN* 的表达在一定程度上能够抑制 *M-CK* 的转录。但是, *M-CK* 基因表达量的上升是否能够引起肌细胞的增生和增殖? 是否能够促进肌肉的生长和发育? 还需进一步研究。

黄河裸裂尻鱼是裂腹鱼亚科鱼类的代表种,在青藏高原淡水生态系统的食物链中具有重要的地位。但是,同裂腹鱼亚科鱼类一样,黄河裸裂尻鱼固有的生物学特性,如生长期短、生长缓慢、性成熟迟、繁殖力低等,极大地限制了该种群的发展。本研究通过 RNA 干扰技术首次对黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因进行干扰,并检测 *MSTN* 表达水平和下游基因的转录水平。这对今后研究高原土著鱼类 *MSTN* 基因在肌肉生长发育中的作用机理奠定了理论基础,具有一定的科学意义。

参 考 文 献

[ 1 ] 武云飞, 吴翠珍. 青藏高原鱼类 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1991.

[ 2 ] Qi DL, Guo SC, Zhao XQ, et al. Genetic diversity and historical population structure of *Schizopygopsis pylzovi* (Teleostei: Cyprinidae) in the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Freshwater Biol*, 2007, 52(6): 1090 - 1104.

[ 3 ] Zhu X, Topouzis S, Liang L F, et al. Myostatin signaling through smad2, smad3 and smad4 is regulated by the inhibitory smad7 by a negative feed back mechanism [J]. *Cytokine*, 2004, 26(6): 262 - 272.

[ 4 ] Mcpherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal mus-

- cle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member [J]. Nature, 1997, 387(6628): 83-90.
- [5] Rios R, Cameiro I, Arce VM, et al. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 282(5): C993-C999.
- [6] 石耀华, 刘军, 夏建红, 等. 银鲫肌酸激酶 M3-CK cDNA 的克隆及其表达特征 [J]. 动物学报, 2003, 49(5): 637-645.
- [7] Hammerschmidt S, Bell M, Büchler N, et al. Acute changes of myocardial creatine kinase gene expression under beta-adrenergic stimulation [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1502(3): 471-480.
- [8] Abraham MR, Selivanov VA, Hodgson DM, et al. Coupling of cell energetics with membrane metabolic sensing: integrative signaling through creatine kinase phosphotransfer disrupted by M-CK gene knock-out [J]. J Biol Chem, 2002, 277(27): 24427-24434.
- [9] 王景圆. Rheb 基因对绒山羊骨骼肌卫星细胞的影响 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2014.
- [10] Weintraub H, Davis R, Tapscott S, et al. The MyoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage [J]. Science, 1991, 251(4995): 761-766.
- [11] Olson EN, Perry M, Schulz RA. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors [J]. Dev Biol, 1995, 172(1): 2-14.
- [12] Carolyn N, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression or homologous genes in trans [J]. Plant Cell, 1990, 2(4): 279-289.
- [13] Guo S, Kempthues KJ. Par 1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative ser/thr kinase that is asymmetrically distributed [J]. Cell, 1995, 81(4): 611-620.
- [14] Murphy KT, Koopman R, Naim T, et al. Antibody-directed myostatin inhibition in 21-mo-old mice reveals novel roles for myostatin signaling in skeletal muscle structure and function [J]. FASEB J, 2010, 24(11): 4433-4442.
- [15] Murphy KT, Cobani V, Ryall JG, et al. Acute antibody-directed myostatin inhibition attenuates disuse muscle atrophy and weakness in mice [J]. J Appl Physiol, 2011, 110(4): 1065-1072.
- [16] 张宁宁, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈肌肉生长抑制素多克隆抗体的制备及其对仔鱼生长影响 [J]. 生物技术通报, 2009, 12: 129-133.
- [17] Lee SB, Kim YS, Oh MY, et al. Improving rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth by treatment with a fish (*Paralichthys olivaceus*) myostatin prodomain expressed in soluble forms in *E. coli* [J]. Aquaculture, 2010, 302(3): 270-278.
- [18] 蓝赐华, 刘为民, 梁梓森. 鸡肌抑素基因的原核表达及蛋白纯化 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008, 27(7): 18-20.
- [19] Kim YS, Bobbili NK, Paek KS, et al. Production of a monoclonal anti-myostatin 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.
- [20] 鲍淑青, 张克英, 陈代文. 猪肌肉生长抑制素基因的克隆及原核表达 [J]. 动物营养学报, 2007, 19(5): 617-621.
- [21] Mepheron AC, Lee SJ. Doubling muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene [J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94(23): 12457-12461.
- [22] 晁燕, 赵兰英, 李长忠, 等. 黄河裸裂尻鱼肌肉生长抑制素基因克隆及表达分析 [J]. 动物学研究, 2012, 33(5): 473-480.
- [23] Livak KJ, Schmittgen TD. 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.
- [24] 程波, 李利, 王林杰, 等. MEF2 基因家族的研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(15): 70-74.
- [25] Wu W, de Folter S, Shen X, et al. Vertebrate paralogous MEF2 genes: origin, conservation, and evolution [J]. PLoS One, 2011, 4(6): e17334.
- [26] Brand N J. Myocyte enhancer factor 2 (MEF2) [J]. Int J Biochem Cell Biol, 1997, 29(12): 1467-1470.
- [27] Spiller MP, Kambadur R, Jeanplong F, et al. The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(20): 7066-7082.

[收稿日期] 2016-01-08