

# 崂山奶山羊 *Myostatin* 基因真核表达载体的构建及其在成纤维细胞中的表达研究

唐大运<sup>1,2,3</sup>, 陈晓亮<sup>1,2</sup>, 吴健敏<sup>3</sup>, 朱化彬<sup>1</sup>, 杜卫华<sup>1</sup>, 王栋<sup>1</sup>, 赵学明<sup>1</sup>, 陈汉忠<sup>2</sup>, 林秀坤<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 广西大学动物科技学院, 广西南宁 530004;

3. 广西兽医研究所, 广西南宁 530001)

**摘要:** 试验克隆了崂山奶山羊 *Myostatin* 基因序列, 构建了其真核表达载体, 并验证了其在成纤维细胞中的表达。本研究通过从崂山奶山羊肌肉组织中提取 RNA, 反转录后采用巢式 PCR 方法扩增出 *Myostatin* 基因序列, 构建真核表达载体, 通过转染成纤维细胞, 采用 RT-PCR 方法验证其表达。结果表明, 克隆出崂山奶山羊 *Myostatin* 基因的全长 cDNA 序列, 大小为 1128 bp, GenBank 登录号: GU377303.1; 构建 pcDNA-MSTN 真核表达载体, 转染成纤维细胞 48 h 后通过 RT-PCR 检测, 结果显示, *Myostatin* 表达量显著增加, 表明成功构建 pcDNA-MSTN 真核表达载体, 为进一步研究 *Myostatin* 的生物学功能及转基因羊培育奠定基础。

**关键词:** 崂山奶山羊; 肌肉生长抑制素; 真核表达载体; 成纤维细胞; 巢式 PCR

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2012)01-0037-03

肌肉生长抑制素 (*Myostatin*, *MSTN*) 又名 *GDF8* (growth differentiation factor 8), 属 *TGF- $\beta$*  (transforming growth factor beta) 超家族 (Mcpherron 等, 1997), 是肌肉生长发育的负调控因子。该基因突变的皮尔蒙特和比利时蓝牛具有显著“双肌”现象 (Kambadur 等, 1997), 实验室培育的 *Myostatin* 基因沉默的鼠 (Magee 等, 1997) 及斑马鱼 (Lee 等, 2009) 肌肉也明显增生。另有相关研究结果表明, *Myostatin* 在脂肪沉积中也发挥着重要的作用 (Mcpherron 等, 2002; Lee 等, 2007; Reisz-Porszasz 等, 2003), 但尚无明确定论。崂山奶山羊是中国培育成功的优良奶山羊品种之一, 该羊体质结实, 结构匀称, 产奶量高。为进一步提高崂山奶山羊的肉用性能, 培育出产肉性能较高的奶肉兼用的崂山奶山羊, 研究 *Myostatin* 在脂肪沉积中的作用, 本研究欲克隆出崂山奶山羊的 *Myostatin* 基因, 构建真核表达载体, 为后期研究提供基础。

## 1 材料与与方法

**1.1 试验材料** 大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、LA *Taq* 酶购自 TaKaRa 公司; RNA 提取试剂盒 (TIANGEN);

Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen); 反转录试剂盒购自 TRANS 公司; DMEM、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清、高糖 DMEM、0.25% Trypsin-EDTA、10000 U/mL 青霉素和 10000  $\mu$ g/mL 链霉素均购自 GIBCO 公司。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 巢式 PCR 扩增 *MSTN* 基因** 从小尾寒羊肌肉组织 (青岛畜牧兽医研究所羊场) 提取 RNA (按 TIANGEN 试剂盒进行), 并进行反转录 (按 TRANS 试剂盒进行), 反应体系: LA *Taq* 0.5  $\mu$ L, 10 $\times$  LA PCR Buffer 5.0  $\mu$ L, dNTP Mixture 8  $\mu$ L, RNA 模板 5  $\mu$ L。

反应体系: LA *Taq* 0.5  $\mu$ L, 10 $\times$  LA PCR Buffer 5.0  $\mu$ L, dNTP Mixture 8.0  $\mu$ L, 模板 5.0  $\mu$ L, 引物 (10  $\mu$ mol/L) 2.0  $\mu$ L, 加双蒸水至 50.0  $\mu$ L。第 1 轮 PCR 引物: QMSTNS: 5'-TTACTCAAAGCAAAGAAAAG-3', QMSTNA: 5'-TAGCTTGTGCTTAAGTGACTGT-3'; 第 2 轮 PCR 引物: MSTNS: 5'-CGCGGATCCATGCAAAAACTGCAAATCTCTG-3', MSTNA: 5'-TAGCTCGAGTCATGAACACCCACAGCGATCT-3'。反应条件: 第一轮: 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 28 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。第二轮: 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 75 s, 28 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像系统下, 割取目的条带, 用凝胶回收试剂盒回收目的产物。

收稿日期: 2011-05-25

作者简介: 唐大运 (1984-), 男, 安徽人, 硕士生, 主要从事动物生物技术研究。

通信作者: 林秀坤。E-mail: linxiukun@yahoo.com

陈汉忠。E-mail: chenhanz211@sohu.com

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08010-024B; 2008ZX08008-003; 2009ZX08006-013B)。

**1.2.2 pMD18-MSTN 载体的构建** 回收 PCR 产物 1.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 3.0  $\mu\text{L}$ , pMD18-T 1.0  $\mu\text{L}$ , Ligation solution 5.0  $\mu\text{L}$ , 16  $^{\circ}\text{C}$  连接 30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。将构建的载体转化 DH5 $\alpha$ : ①将上述连接后的反应液 10  $\mu\text{L}$  转入 100  $\mu\text{L}$  的 DH5 $\alpha$  感受态菌液中, 轻柔混匀, 冰浴 30 min。②42  $^{\circ}\text{C}$  热休克 90 s, 冰浴 2 min。③每管加入 LB 液体培养基 400  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  200 r/min 振荡培养 1 h。④将 100  $\mu\text{L}$  菌液, 均匀涂布于含氨苄青霉素的 LB 选择平板上, 置 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱, 待菌液吸收后, 倒置培养 8~12 h。挑取单克隆菌落进行摇菌, 8~12 h 进行菌液 PCR 鉴定, 挑取阳性菌液并进行测序鉴定。

**1.2.3 pcDNA-MSTN 的载体的构建** 酶切消化 pcDNA3.1 反应体系如下: 灭菌去离子水 11  $\mu\text{L}$ , pcDNA3.1 或 pMD-MSTN 5  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  M Buffer 2  $\mu\text{L}$ , BamH I 1  $\mu\text{L}$ , Xho I 1  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  2 h, 琼脂糖凝胶电泳回收产物, 并从凝胶中回收酶切后的目的片段, 步骤按照凝胶回收试剂盒的进行。连接反应, 反应体系: 质粒载体 1.0  $\mu\text{L}$ , DNA 5.0  $\mu\text{L}$ , T4 连接酶 0.5  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  Buffer 1.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 7.0  $\mu\text{L}$ , 16  $^{\circ}\text{C}$  过夜。转化方法同上。菌液经 PCR 鉴定、测序鉴定、鉴定正确的菌液提取质粒进行酶切鉴定。

**1.2.4 真核表达载体在成纤维细胞中表达鉴定** 从 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱取出小尾寒羊成纤维细胞, 迅速放入 38  $^{\circ}\text{C}$  水浴中解冻, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 2 mL 完全培养基将细胞吹打混匀并转移至 25 cm<sup>2</sup> 的培养瓶中, 待细胞接触密度约 90% 时传至 6 孔板中, 第 2 天按照 Lipofectamine 2000 说明书进行转染, 48 h 收集细胞, 提取 RNA (按 TIANGEN 试剂盒进行), 并进行反转录 (按 TRANS 试剂盒进行), PCR 检测 *Myostatin* 基因表达量, 以 GAPDH 作为内参对照, 引物如下: GAPDHF: 5'-TTGTGATGGGCGTGAACC-3', GAPDHR: 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'; MSTNF: 5'-AGAACAGCGAGCAGAAGGAA-3', MSTNR: 5'-GAGATCGGATTCCAGTAT-3'。

反应体系: LA Taq 0.5  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  LA PCR Buffer 5.0  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture 8.0  $\mu\text{L}$ , 模板 5.0  $\mu\text{L}$ , 引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 2.0  $\mu\text{L}$ , 加双蒸水至 50.0  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s, 28 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**2 结果与分析**

**2.1 MSTN 基因 PCR 扩增** 从小尾寒羊肌肉组织提取 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测显示 28S 约是

18S 的 2 倍, 说明提取的 RNA 质量较好 (图 1)。采用巢式 PCR 的方法扩增 MSTN 基因, 提取的 RNA 经反转录后, 进行第一轮 PCR, 以第一轮 PCR 的产物作为模板进行第二轮 PCR, 巢式 PCR 产物经电泳检测, 在 1128 bp 处出现条带, 与目的条带片段大小相符, PCR 产物经测序鉴定, 结果正确 (图 2)。

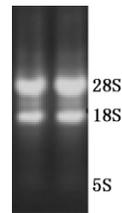


图 1 RNA 电泳图

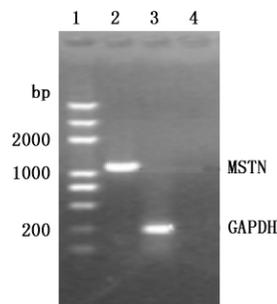


图 2 电泳检测巢式 PCR 扩增 MSTN 基因

注: 1 为 DNA Marker; 2 为巢式 PCR 扩增 MSTN 基因 (1128 bp); 3 为内参基因 GAPDH (200 bp); 4 为空白对照。

**2.2 pMD-MSTN 载体的构建** 将扩增出的 MSTN 基因连接至 pMD18-T 载体上, 转化至 DH5 $\alpha$ , 挑取单克隆菌落进行 PCR 鉴定, 提取测序鉴定的阳性菌液的质粒, 该质粒命名为 pMD-MSTN。

**2.3 真核表达载体的构建** pMD-MSTN 与 pcDNA3.1 经 BamH I 和 Xho I 酶切后, 目的条带回收, 经连接, 转化至 DH5 $\alpha$ , 进行菌液 PCR 鉴定 (图 3), 其中 8 号孔片段大小为 1128 bp, 经测序鉴定该序列正确, 将该质粒命名为 pcDNA-MSTN, 提取质粒进行酶切鉴定 (图 4)。

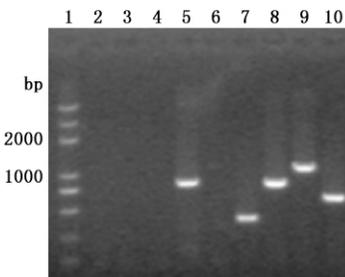


图 3 菌液 PCR 鉴定

注: 1 为 DNA Marker; 2 为空白对照; 3 为阴性对照; 4~10 为菌液 PCR。

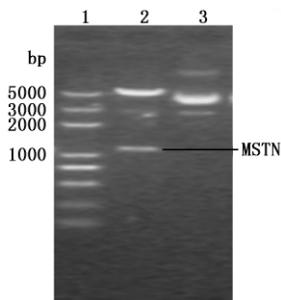


图 4 pcDNA-MSTN 酶切鉴定结果

注:1 为 DNA Marker;2 为 pcDNA-MSTN 酶切后产物;3 为 pcDNA-MSTN 质粒。

**2.4 真核表达载体 pcDNA-MSTN 在成纤维细胞中表达鉴定** 将 pcDNA-MSTN 转染羊成纤维细胞,48 h 后收集细胞提取 RNA,采用半定量 RT-PCR 检测 MSTN 表达量,琼脂糖凝胶电泳检测结果显示转染 pcDNA-MSTN 的羊成纤维细胞 MSTN 表达量明显上升(图 5),说明构建 pcDNA-MSTN 真核表达载体能够表达 MSTN。

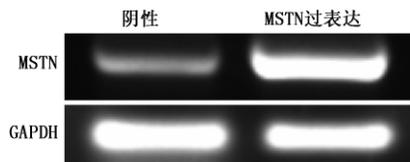


图 5 半定量 RT-PCR 检测 pcDNA-MSTN 在成纤维细胞中的表达

**2.5 序列分析** 将崂山奶山羊 *Myostatin* 基因序列提交至 GenBank,登录号:GU377303.1。崂山奶山羊 *Myostatin* 基因序列与山羊 *Myostatin* 基因序列(登录号:AY436347)进行比对,同源率为 99%,碱基分别在第 20 位(C-T)、46 位(A-C)、48 位(C-T)、87 位(C-G)、163 位(G-A)、467 位(T-G)、584 位(C-A)、717 位(A-T)、877 位(G-T)发生改变,造成的氨基酸突变点分别为 7 位(F-S)、29 位(Q-H)、55 位(T-A)、156 位(R-L)、195 位(D-A)、293 位(F-V);与绵羊 *Myostatin* 基因序列(NM\_001009428.1)比对碱基分别在 126 位(C-T)、163 位(G-A)、189 位(G-A)、467 位(T-G)、717 位(A-T)、903 位(T-C)、930 位(T-C)、1122 位(C-T)发生改变,造成的氨基酸突变点分别为 55 位(T-A)、156 位(R-L)。

### 3 讨论

本研究利用巢式 PCR 克隆出崂山奶山羊 *Myostatin* 基因,构建其真核表达载体,并在羊成纤维细胞中验证其表达,为进一步研究 *Myostatin* 相关基

因的表达调控奠定了基础。*Myostatin* 在肌肉组织中的表达量较低,且在不同时期表达量不同。在牛上的研究结果发现,发育到 16 d 时的牛胚胎中可检测到 *Myostatin* mRNA 的表达,29 d 时表达量开始增加,82 d 时表达量达到最高。在猪上的研究结果发现,胚胎发育到 21 d 时可以检测到 *Myostatin* 的表达,105 d 时开始降低,出生 14 d 后表达水平降到最低(Sonstegard 等,1998)。本研究在成年羊上很难扩增出该基因,最终在 10 日龄的羔羊中扩增出该基因,可能 *Myostatin* 基因在成年羊中的表达量较低,在羔羊中的表达仍较为丰富。*Myostatin* 在肌肉发育中负调控作用已得到认可,但在脂肪沉积中作用的报道存在争议。*Myostatin* 基因突变纯合体小鼠脂肪含量较少,与正常小鼠相比体脂肪约减少 70%。皮尔蒙特及比利时蓝牛同样也存在肌肉发达,脂肪含量低的情况。肌肉与脂肪作为机体的主要成分,能量代谢的主要去向,是肉质及机体健康的重要评价指标。深入了解 *Myostatin* 在脂肪沉积的作用及表达调控,有望为肥胖症的治疗找到新的突破点,具有十分重要的意义。本研究克隆出崂山奶山羊 *Myostatin* 基因,为后续的研究奠定了基础。

### 参 考 文 献

- 1 Kambadur R, Sharma M, Smith T P, et al. Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res*, 1997(9): 910~916.
- 2 Lee C Y, Hu S Y, Gong H Y, et al. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebra fish. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 387: 766~771.
- 3 Lee S J. Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways. *PLoS One*, 2007, 2(8): e789.
- 4 Magee T R, Artaza J N, Ferrini M G, et al. Myostatin short interfering hairpin RNA gene transfer increases skeletal muscle mass. *J Gene Med*, 2006, 8: 1171~1181.
- 5 McPherron A C, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the *Myostatin* gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(23): 12457~12461.
- 6 McPherron A C, Lee S J. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest*, 2002, 109(5): 595~601.
- 7 Reisz-Porszasz S, Bhasin S, Artaza J N, et al. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 285(4): 876~888.
- 8 Sonstegard T S, Rohrer G A, Smith T P. Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. *Anim Genet*, 1998, 29(1): 19~22.

# 减毒沙门氏菌在疫苗和疫苗载体方面的研究进展

李正,程相朝

(河南科技大学动物科技学院,河南洛阳 471003)

**摘要:**沙门氏菌不仅可以用作疫苗,也是理想的疫苗载体,已受到医学与兽医学的广泛重视。沙门氏菌可以经黏膜途径免疫(口服或鼻内),操作方便,对接种对象刺激小;此外,沙门氏菌为胞内侵袭细菌,能有效递呈抗原,激发抗沙门氏菌和诱导外源蛋白的特异性体液免疫反应与细胞免疫反应,并能同时诱导黏膜免疫与全身免疫。文章对沙门氏菌的入侵机制、免疫机理及其在疫苗中的应用状况进行了综述,为新型疫苗的研究提供参考。

**关键词:**沙门氏菌;疫苗;载体

中图分类号:S852.61

文献标识码:A

文章编号:1671-7236(2012)01-0040-05

沙门氏菌是重要的人兽共患病病原,在医学、兽医学和公共卫生学上均具有十分重要的意义(蔡宝祥等,2001)。减毒沙门氏菌是通过物理、化学或基因工程等方法,使沙门氏菌某些特定的基因发生不可逆的突变而降低其毒力(Shata等,2000)。现代医学中,疫苗接种是预防传染病最有效的方法,减毒沙门氏菌不但能作为疫苗,而且已被证实是理想的

疫苗载体,减毒沙门氏菌作为载体可激发强烈的体液免疫、细胞免疫和黏膜免疫,在研制基因工程疫苗方面显现了独特的优越性。近年来,应用各种基因工程方法构建沙门氏菌减毒株、研究毒力基因的功能和表达调控以及利用减毒沙门氏菌作为活载体表达外源抗原,研制多价疫苗等已成为该领域的研究热点。

## 1 减毒沙门氏菌基因缺失疫苗

沙门氏菌的基因缺失大体上可分为两种,代谢性途径和营养缺陷性途径(訾占超等,2009),在疫苗研究中,最广泛用来减毒的沙门氏菌毒力基因有10种之多(表1)。通过各种方法减毒后的沙门氏菌对人和动物的致病力显著降低,但仍然保持良好的侵袭力和免疫原性。

修回日期:2011-08-01

**作者简介:**李正(1987—),男,河南人,硕士生,研究方向:动物疫病发生的分子与免疫学机制。

**通信作者:**程相朝(1966—),男,教授,硕士生导师,主要从事动物疫病发生的分子与免疫学机制研究。E-mail: chenxch@126.com

**基金项目:**河南省自然科学基金项目(0711032300)。

## Construction of Eukaryotic Expression Vector of Laoshan Dairy Goat Myostatin and its Expression in the Fibroblast Cells

TANG Da-yun<sup>1,2,3</sup>, CHEN Xiao-liang<sup>1,2</sup>, WU Jian-min<sup>3</sup>, ZHU Hua-bin<sup>1</sup>, DU Wei-hua<sup>1</sup>,  
WANG Dong<sup>1</sup>, ZHAO Xue-ming<sup>1</sup>, CHEN Han-zhong<sup>2</sup>, LIN Xiu-kun<sup>1</sup>

(1. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

3. Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China)

**Abstract:** This study aimed to clone cDNA of Myostatin of Laoshan dairy goat, and to construct Myostatin eukaryotic expression vector, analyzing its expression in the fibroblast cells. RNA was extracted from skeletal muscle and then reverse transcribed into cDNA. Myostatin was amplified by nested PCR. Myostatin was cloned into pcDNA3.1 to synthesize an eukaryotic expression vector, pcDNA-MSTN and its expression was detected by RT-PCR after transfected into the fibroblast cells. The results showed that the sequence of the full length cDNA of *Myostatin* gene of Laoshan dairy goat was similar with other species of goats and GenBank accession number was GU377303.1. The expression of Myostatin was significantly increased as detected by RT-PCR in fibroblast cells transfected with the expression vector. The study provided a basis for further study of the biological function of Myostatin and transgenic goat.

**Key words:** Laoshan dairy goat; Myostatin; eukaryotic expression vector; fibroblast; nested PCR